

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Neurotoxicidad inducida por deltametrín sobre el metabolismo
aminoacidérgico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Marina Paz Sánchez

Directores

María Rosa Martínez Larrañaga

Irma Ares Lombán

Alejandro Romero Martínez

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR
DELTAMETRÍN SOBRE EL METABOLISMO
AMINOACIDÉRGICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

MARINA PAZ SÁNCHEZ

Bajo la dirección de los Profesores Doctores

María Rosa Martínez Larrañaga

Irma Ares Lombán

Alejandro Romero Martínez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR
DELTAMETRÍN SOBRE EL METABOLISMO
AMINOACIDÉRGICO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

MARINA PAZ SÁNCHEZ

Bajo la dirección de los Profesores Doctores

María Rosa Martínez Larrañaga

Irma Ares Lombán

Alejandro Romero Martínez

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR
DELTAMETRÍN SOBRE EL METABOLISMO
AMINOACIDÉRGICO**

**Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Toxicología y Farmacología**

MARINA PAZ SÁNCHEZ

Madrid, 2017

Trabajo financiado por:

- Proyecto Grupo de Investigación UCM: 920204 TOXIAQBI, Ref. GR3/14 “Toxicología y Seguridad de Agentes Químicos y Biológicos”. Programa de financiación de la UCM-Banco de Santander, para Grupos de Investigación UCM validados.
- Convenio de Colaboración entre el Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural) y la Universidad Complutense de Madrid para la “Evaluación científica de datos toxicológicos y ecotoxicológicos sobre productos químicos y biotecnológicos y su vinculación con los reglamentos REACH y CLP y la normativa nacional y comunitaria sobre los organismos modificados genéticamente”.

Deseo expresar mi agradecimiento,

A mis Directores de Tesis Doctoral, los Profesores Dra. María Rosa Martínez Larrañaga, Catedrática de Toxicología, Dra. Irma Ares Lombán, Contratado Doctor de Toxicología y Dr. Alejandro Romero Martínez, Contratado Doctor Interino de Toxicología, del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid por todas sus enseñanzas, confianza y el apoyo recibido a lo largo de este periodo de mi formación que han conducido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Profesor Dr. Arturo Anadón Navarro, Catedrático de Toxicología y Legislación Sanitaria, que de forma tan generosa me aceptó a formar parte del Grupo de Investigación que dirige, que ha contribuido con su permanente ayuda y estímulo a que esta Tesis Doctoral pueda ser presentada.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Universidad Complutense de Madrid por la ayuda recibida, en particular a la Prof. Dra. María Aránzazu Martínez, que me han animado siempre para la realización y consecución de este trabajo.

A la Dra. Ana Fresno Ruiz, Subdirectora General Adjunta de la Subdirección General de Calidad del Aire y Medio Ambiente Industrial del Ministerio de Agricultura, Pesca Alimentación y Medio Ambiente, y D. Manuel Carbó Martínez, Director del Centro de Investigación y Control de la Calidad (CICC) del Instituto Nacional del Consumo, por su apoyo durante todos estos años.

A mi colega y amiga Marta Portolés Méndez por acompañarme a lo largo de toda esta etapa, compartiendo nervios y trabajando codo con codo en el laboratorio.

A mi madre, por inculcarme el amor por los libros y al trabajo bien hecho, y por todos los sacrificios que hizo en pro de mi educación.

A Alfonso, mi compañero de cordada, por apoyarme en todo momento, por su paciencia y su inestimable ayuda. Por hacer malabares para que llegáramos a todo. Esta Tesis también es tuya.

A Sergio, porque tu sonrisa es mi motor,
y todos mis futuros son contigo.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
MADRID

**Departamento de Toxicología
y Farmacología
Facultad de Veterinaria
28040 Madrid**

Prof. Dra. María Rosa Martínez Larrañaga, Catedrática de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

Prof. Dra. Irma Ares Lombán, Profesora Contratado Doctor de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

Prof. Dr. Alejandro Romero Martínez, Profesor Contratado Doctor Interino de Toxicología del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN que Doña MARINA PAZ SÁNCHEZ

Ha realizado bajo nuestra dirección su Tesis Doctoral titulada **“Neurotoxicidad Inducida por Deltametrín sobre el Metabolismo Aminoacidérgico”** en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid, a

19 de abril de dos mil diecisiete.

Prof. Dra. María Rosa Martínez Larrañaga

Prof. Dra. Irma Ares Lombán

Prof. Dr. Alejandro Romero Martínez

ÍNDICE

ÍNDICE

1.	ABREVIATURAS.....	1
2.	RESUMEN.....	6
3.	INTRODUCCIÓN.....	14
3.1.	PIRETROIDES	14
3.1.1.	Estructura química y desarrollo de los piretroides	15
3.1.2.	Clasificación de los piretroides	21
3.1.3.	Mecanismo de acción	25
3.2.	DELTAMETRÍN.....	50
3.2.1.	Estructura química, propiedades físico-químicas y espectro de acción	50
3.2.2.	Mecanismo de acción	57
3.2.3.	Metabolismo y toxicocinética	59
3.2.4.	Toxicidad en mamíferos	64
3.2.5.	Ecotoxicología.....	71
3.3.	NEUROTOXICIDAD	73
3.4.	OBJETIVOS DEL TRABAJO	93
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	96
4.1.	PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL	96
4.1.1.	Pautas de tratamiento y grupos experimentales	97
4.1.1.1.	Estudio de aminoácidos neurotransmisores	97
4.1.1.2.	Estudio de aminas biógenas	98
4.2.	MÉTODOS ANALÍTICOS.....	101
4.2.1.	Determinación de aminoácidos neurotransmisores.....	102
4.2.2.	Determinación de aminas biógenas	108
4.3.	REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO.....	114
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	116
5.	RESULTADOS.....	118
5.1.	EFFECTOS DEL DELTAMETRÍN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES EN SNC.....	119
5.2.	EFFECTOS DEL DELTAMETRÍN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN SNC	125
6.	DISCUSIÓN.....	141
7.	CONCLUSIONES.....	168
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	173

ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

3-MT: 3-metoxitiramina

3-PBAldérido: 3-fenoxibenzaldehído

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT: Serotonina

5-HTP: 5-hidroxitriptófano

AADC: aminoácido aromático descarboxilasa

ACC: Corteza cingulada anterior

ADI: Ingesta Diaria Admisible

Ag/AgCl: plata/cloruro de plata

AH: Aldehído deshidrogenasa

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

AMP_c: adenosin monofosfato cíclico

AOEL: Nivel de exposición admisible para el operario

ARfD: Dosis aguda de referencia

Asp: aspartato

ATP: adenosin-trifosfato

AUC: Área bajo la curva

Br₂CA: Ácido decametánico

°C: grados Celsius

Ca²⁺: Ión calcio

CAS: Chemical Abstracts Service

cm: Centímetro

Cl⁻: Ión cloruro

CL₅₀: concentración letal media o 50

COMT: Catecol-O-metiltransferasa

DA: Dopamina

DE₅₀: Dosis-efectiva media o 50

DL₅₀: dosis letal media o 50

DMSO: dimetilsulfóxido

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DRG: ganglio de la raíz dorsal

EEG: electroencefalograma

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EE.UU.: Estados Unidos

ESM.: error estándar de la media

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

g: Gramo

GABA: Ácido γ -aminobutírico

GABA_A (receptor): Complejo receptor GABA-ionóforo del cloro

GAD: Glutamato descarboxilasa

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

GMP_C: guanosina monofosfato cíclico

GSH: Tripéptido glutatión

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HVA: Ácido homovalínico

ITCA: ácido iminotiazolidina-4-carboxílico

i.c.: intracerebral

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenosa

K⁺: Ión potasio

KA: Ácido kaínico

kdr: resistencia kdr ('knockdown resistance')

kg: kilogramo

LC: locus coeruleus

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina

LMRs: límites máximos de residuos

LOAEC: concentración mínima de efecto adverso observable

M: molar (mol/litro)

MAO: Monoamino oxidasa

MEC: Matriz extracelular

mGluR: Receptor metabotrópico de glutamato

µg: Microgramo

µl: Microlitro

µm: micrometro

mg: Miligramo

min: minuto

mM: Milimol/litro

ml: Mililitro

mm: Milímetro

MSN: Neurona espinosa mediana

m-PBA, mPBAC o 3-PBA: Ácido 3-fenoxibenzoico

miliQ: miliequivalentes

mV: milivoltio

N: normalidad

Na⁺: Ión sodio

NAcc: Núcleo accumbens

NaOH: Hidróxido de sodio

ng: nanogramo

NMDA: ácido N -metil-D-aspartato

NOAEC: concentración sin efecto adverso observable

NOAEL: nivel sin efecto adverso observable

OFC: Corteza orbitofrontal

OH-Br₂CA: derivado hidroximetil del ácido decametánico

OPA: O-phthaldialdehyde

p.c.: peso corporal

PKC: proteína quinasa C

ppm: partes por millón

p/v: Peso/volumen

r.p.m.: revoluciones por minuto

SF: factor de seguridad

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

SNpc: Sustancia negra pars compacta

Super-kdr: superresistencia kdr

$t_{1/2}$: semivida

Tau: taurina

TTX: tetrodotoxina

TTX-resistente: tetrodotoxina-resistente

TTX-sensible: tetrodotoxina-sensible

U.E.: Unión Europea

US EPA: Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los EE.UU.

V: Voltio

v.o.: vía oral

VGLUT: Molécula transportadora de glutamato

vs: versus

v/v: Volumen/volumen

Vd(área): volumen de distribución aparente

Vd(ss): volumen de distribución en estado estacionario

WHO (OMS): Organización Mundial de la Salud

X: media

RESUMEN

2. RESUMEN

Introducción. Los piretroides son insecticidas sintéticos empleados en variedad de aplicaciones. El deltametrín es un insecticida piretroide Tipo II de amplio espectro, muy utilizado tanto en agricultura como en el control de vectores en salud pública y animal, incorporándose incluso en aerosoles de uso doméstico. La mayoría de los piretroides se presentan como al menos dos isómeros, pero el deltametrín se comercializa como un único isómero (*cis*). El sistema nervioso es su principal sitio de acción, debido principalmente a su efecto sobre los canales de sodio voltaje dependientes, así como sobre los canales de calcio y a su interacción con el complejo receptor GABA-ionóforo del cloro. Aunque inicialmente se consideró un insecticida de baja toxicidad en mamíferos, diversos estudios han demostrado que es neurotóxico en roedores y en otras especies animales, causando en ratas el *Síndrome CS* que se caracteriza por salivación, ataxia, convulsiones y parálisis. Existe información limitada sobre los efectos del deltametrín a nivel de los aminoácidos neurotransmisores y las catecolaminas en el sistema nervioso central (SNC). El objetivo del presente trabajo es obtener nueva información sobre los mecanismos de neurotoxicidad de los piretroides Tipo II como el deltametrín, estudiando en el SNC de ratas: i) sus efectos sobre las concentraciones de los aminoácidos neurotransmisores aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA, y ii) sus efectos sobre los niveles de las aminas biógenas noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT), y de los metabolitos de las dos últimas (DOPAC, HVA y 5-HIAA). Las regiones cerebrales estudiadas fueron hipófisis, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo, corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo.

Material y Métodos. Se utilizaron 30 ratas macho Wistar adultas de peso corporal entre 190 y 200 g, de las cuales, 15 se utilizaron para el estudio de los efectos del deltametrín

sobre la concentración de los aminoácidos neurotransmisores, y las otras 15 para el estudio de los efectos del deltametrín sobre la concentración de aminas biógenas. El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los requerimientos éticos. Las ratas se distribuyeron en tres grupos para cada una de las determinaciones anteriormente descritas (5 animales por grupo; grupo control, grupo I y grupo II). Los animales del grupo control recibieron el vehículo aceite de maíz, vía oral, 5 días; los animales de los grupos tratados recibieron 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día, 5 días, vía oral, respectivamente. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación 24 horas después de recibir la última dosis de tratamiento, aislándose en frío las regiones cerebrales objeto de estudio y almacenándose a -80°C hasta su análisis. El análisis y cuantificación de los aminoácidos neurotransmisores se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia tras una reacción de derivatización con O-phthaldialdehyde (OPA) en medio alcalino, y utilizándose dos fases móviles en gradiente. Las rectas de calibrado fueron lineales a las concentraciones de 10,5, 21, 42, 84, 210, 420 µg/ml. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para los cinco aminoácidos. El análisis y cuantificación de las catecolaminas se realizó por HPLC con detección electroquímica. Las curvas estándar fueron lineales para concentraciones en el rango de 1 ng/ml hasta 300 ng/ml para NA, DOPAC y HVA; en el rango de 1 ng/ml hasta 1000 ng/ml para DA; y en el rango de 5 ng/ml hasta 500 ng/ml para 5-HT y 5-HIAA. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100%.

Resultados y discusión. El deltametrín origina un aumento significativo dosis-dependiente de los niveles de NA en todas las regiones estudiadas ejerciendo un papel

neuromodulador frente a los procesos de excitotoxicidad y daño neuronal ejercido por el piretroide. Se destaca el efecto de depleción de los aminoácidos taurina y GABA en las regiones cerebrales corteza frontal (-28,84% y -19,36%, respectivamente) y cuerpo estriado (-26,51% y -22,35, respectivamente) tras la dosis de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Con respecto al efecto del deltametrín sobre los niveles de 5-HT y su metabolito es de destacar el descenso de ambos en cuerpo estriado (-26,86% y -29,60%, respectivamente) tras la dosis de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Asimismo, los niveles de DA en cuerpo estriado descendieron significativamente (-26,71%) tras la dosis de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, confirmando el efecto neurotóxico y la afinidad del deltametrín sobre esta región. En hipocampo induce un incremento significativo dosis-dependiente de los niveles de aspartato, glutamato y glutamina, indicando la disrupción del ciclo neurona-astrocito/glutamato-glutamina, contribuyendo al desarrollo y progresión de un proceso de excitotoxicidad, junto con un descenso de la tasa metabólica de DA que podría favorecer la muerte neuronal. En cerebelo induce el desarrollo de hiperexcitabilidad cerebelar en base al aumento observado de los aminoácidos aspartato, glutamato y glutamina. En hipotálamo e hipófisis se observa un aumento de los niveles de glutamina de acuerdo con su papel neuroprotector y la disrupción dopaminérgica entre ambos tejidos. En bulbo raquídeo induce un descenso de los niveles de glutamina. En mesencéfalo induce un descenso de los niveles de DA y de su metabolito DOPAC.

Conclusiones. En función de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo, se debe destacar que el piretroide Tipo II deltametrín puede originar una depleción de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA principalmente en las regiones cerebrales corteza frontal y cuerpo estriado, así como también una depleción de dopamina y serotonina en cuerpo estriado, efectos que pueden contribuir a inducir

desórdenes neurodegenerativos en la población expuesta. Nuestros resultados deben ser tomados en cuenta en futuras evaluaciones del riesgo de este tipo de insecticidas a efectos de salud pública.

ABSTRACT

Introduction. Pyrethroids are synthetic insecticides used in a variety of applications. Deltamethrin is a broad-spectrum Type II pyrethroid insecticide, largely used in agriculture and as a vector control in public and animal health, added even in household spray formulations. Most pyrethroids exist as at least two isomers, unlike deltamethrin is marketed as a single isomer (*cis*). The nervous system is its main target, mainly due to its effect on voltage sensitive sodium channels, as well as on calcium channels and to its interaction with the GABA receptor-ionophore complex. Although it was initially considered to have a low toxicity in mammals, several reports demonstrated deltamethrin induces neurotoxicity in rodents and other animals, causing in rats the *CS-Syndrome*, characterized by salivation, ataxia, hyperexcitation, convulsions, and paralysis. There is limited information about the effects of deltamethrin on the levels of amino acid neurotransmitters and catecholamines in the central nervous system (CNS). The objective of the present study is to obtain new information on the mechanisms of neurotoxicity of Type II pyrethroids as deltamethrin, studying in the CNS of rats: i) its effects on the concentrations of the amino acid neurotransmitters aspartate, glutamate, glutamine, taurine and GABA, and ii) its effects on the levels of the monoamines noradrenaline (NA), dopamine (DA) and serotonin (5-HT), and on the metabolites of the two last ones (DOPAC, HVA and 5-HIAA). The brain regions studied were pituitary gland, hypothalamus, cerebellum, medulla oblongata, frontal cortex, hippocampus, striatum and midbrain.

Material and Methods. 30 adult male Wistar rats were used, each weighing 190-200 g; 15 rats were used to study the effects of deltamethrin on the concentration of the amino acid neurotransmitters, and the other 15 rats were used to study the effects of deltamethrin on the concentration of monoamines. The study was undertaken in

accordance with the ethics requirements. The rats were divided in three groups for each of the studies described above (5 animals per group; control group, group I and group II). The animals from the control group were orally treated with the vehicle corn oil; the animals from the treated groups were orally treated with 5 mg and 10 mg deltamethrin/kg bw/day, respectively, for 5 days. The animals were euthanized by cervical dislocation and decapitation 24 hours after the last treatment, and the cerebral regions to be studied were dissected out on ice and stored at -80° C until assay. The analysis and quantification of amino acid neurotransmitters were done by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection after derivatization with O-phthaldialdehyde (OPA) in alkaline medium and two gradient mobile phases. The calibration line was linear at concentrations 10.5, 21, 42, 84, 210, 420 µg/ml. Within-day and between-day assay coefficients of variation were less than 4%. Mean analytical recovery was 100% for the five amino acids in the tissue samples. The analysis and quantification of catecholamines were done by HPLC with electrochemical detection. The standard curves were linear for concentrations ranging from 1 ng/ml to 300 ng/ml for NA, DOPAC y HVA; ranging from 1 ng/ml to 1000 ng/ml for DA; and ranging from 5 ng/ml to 500 ng/ml for 5-HT and 5-HIAA. Within-day and between-day assay coefficients of variation were less than 4%. Mean analytical recovery was 100% in CNS tissue samples.

Results and Discussion. Deltamethrin induces a significant dose-dependent increase on NA levels in all cerebral regions studied, playing a neuromodulator role against the excitotoxicity and neuronal damage caused by the pyrethroid. It should be emphasized the depletion effect on the amino acids taurine and GABA in frontal cortex (-28.84% and -19.36%, respectively) and striatum (-26.51% and -22.35, respectively), after the administration of 10 mg deltamethrin/kg bw/day during 5 days. Concerning the effect of

deltamethrin on the levels of 5-HT and its metabolite, it should be noted its significant decrease in striatum (-26.86% and -29.60%, respectively) after the administration of 10 mg deltamethrin/kg bw/day. Furthermore, the DA levels were also significantly decreased in striatum (-26.71%) after the administration of 10 mg deltamethrin/kg bw/day, confirming deltamethrin neurotoxic effect and its affinity for this region. It induces a significant dose-dependent increase on aspartate, glutamate and glutamine levels in hippocampus, indicating disruption of neuron-astrocyte/glutamate-glutamine cycle and contributing to excitotoxicity development and progression, together with a decrease on DA metabolic rate that could contribute to neuronal death. It induces cerebellar hyperexcitability due to the increase observed on aspartate, glutamate and glutamine levels. An increase on glutamine levels is shown in pituitary gland and hypothalamus according to its neuroprotective role, together with dopaminergic disruption between both tissues. Deltamethrin induces a decrease in glutamine levels in medulla oblongata. It induces a decrease in DA levels and its metabolite DOPAC in midbrain.

Conclusions. In view of the results of the present study, it should be highlighted that Type II pyrethroid deltamethrin can originate a depletion of amino acids aspartate, glutamate, glutamine, taurine and GABA, mainly in frontal cortex and striatum, as well as a depletion of DA and 5-HT in striatum. These effects can contribute to neurodegenerative disorders in the exposed population. Our results should be considered in future risk assessments of this kind of insecticides on behalf of public health.

INTRODUCCIÓN

3. INTRODUCCIÓN

3.1. PIRETROIDES

Los piretroides son un tipo de insecticidas sintéticos diseñados a partir de las estructuras de las piretrinas, los seis constituyentes esenciales del insecticida natural pyrethrum, que se extrae de las flores del género *Chrysanthemum* (Elliot, 1995), concretamente de las especies *C. cinereum* y *C. cinerariaefolium*. Los seis compuestos, que conforman el grupo de las piretrinas, se denominan piretrinas I y II, cinerinas I y II y jasmolinas I y II.

El extracto del pyrethrum se considera uno de los insecticidas naturales más potentes, pero su utilización se ve restringida debido a su inestabilidad en presencia de luz y aire, lo que limita su efectividad fitosanitaria, y en otros contextos del control de poblaciones de insectos, en los que una actividad insecticida residual es esencial. Los piretroides se desarrollaron a partir de reiteradas modificaciones estructurales de las piretrinas, con el objetivo de sintetizar compuestos más fotoestables, que mantuvieran la potente y rápida actividad insecticida de las piretrinas, además de su relativamente baja toxicidad aguda en mamíferos.

A finales de los años setenta, el registro de los primeros piretroides con suficiente estabilidad ambiental, dio lugar a su rápida expansión, reemplazando a los insecticidas organoclorados y organofosforados (Soderlund, 2010; Cycon y Piotrowska-Seget, 2016), y aunque en un principio se desarrollaron con fines fitosanitarios, actualmente también se utilizan i) para controlar vectores de enfermedades que afectan al ser humano tales como la malaria y otras enfermedades transmitidas por mosquitos (Ranson

et al., 2011), ii) como ectoparasiticidas en medicina veterinaria (Wylie *et al.*, 2014), y iii) como insecticidas de uso doméstico, siendo los más comunes a disposición del público general, lo que se traduce en usos irregulares que aumentan el riesgo de exposición y de efectos adversos en la población (Power y Sudakin, 2007; Ostrea Jr. *et al.*, 2009; Naeher *et al.*, 2010). Así, en 2002, los piretroides representaron, en torno al 18% del mercado mundial de insecticidas, solo superado por los compuestos organofosforados (Pickett, 2004).

3.1.1. Estructura química y desarrollo de los piretroides

LaForge y Haller (1936) fueron los primeros en describir la estructura del pyrethrum natural, demostrando que estaba constituido por ésteres de ácido crisantémico. Las piretrinas son ésteres de un ácido ciclopropanocarboxílico y un alcohol ciclopentenolona (Figura 1), y los primeros piretroides empezaron a sintetizarse utilizándolas como modelos, reemplazando una de estas dos fracciones por nuevas estructuras, mientras la otra fracción se mantenía constante. A su vez, los nuevos piretroides sintetizados se emplearon para diseñar compuestos de nueva síntesis fotoestables y con una elevada actividad insecticida.

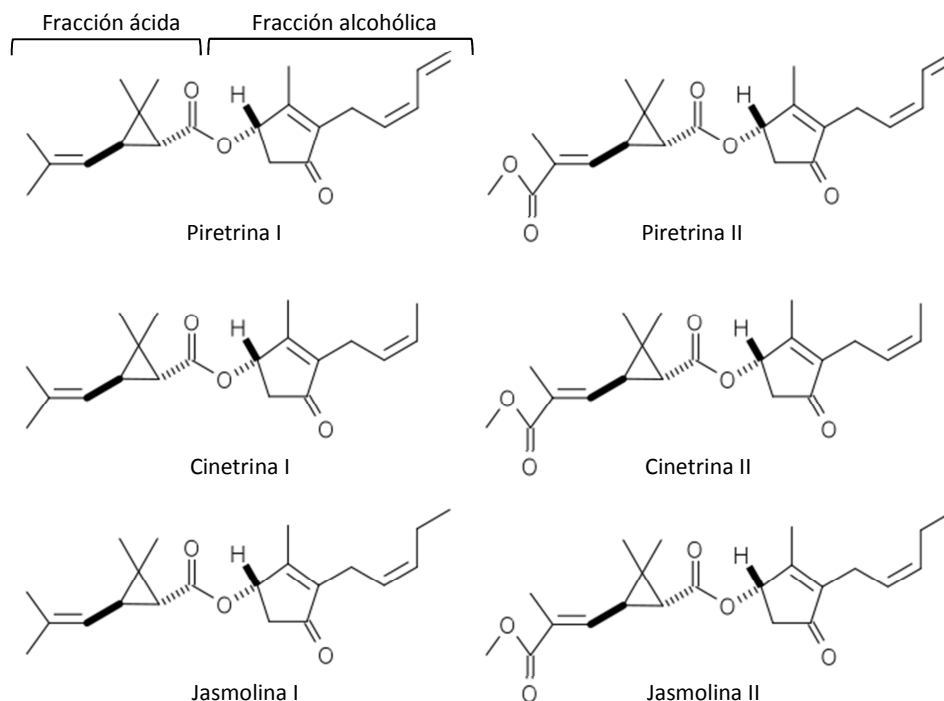


Figura 1. Estructura de las seis piretrinas naturales (Soderlund, 2002).

La sustitución de la cadena lateral pentadienil de la piretrina I por una fracción sintética más simple y accesible, pero con similares propiedades estéricas y electrónicas, dio lugar a la aletrina, uno de los primeros piretroides sintéticos y que actualmente sigue utilizándose. El siguiente avance significativo en el desarrollo de los piretroides se produjo reemplazando el anillo ciclopentenólico de la piretrina I por un anillo furano, y la cadena lateral pentadienil por un anillo bencénico, originándose la resmetrina (Elliot *et al.*, 1967). Este compuesto no solo supuso una mejora en la fotoestabilidad, sino también en la actividad insecticida y disminución en la toxicidad aguda en mamíferos. Otros ejemplos de piretroides importantes a nivel comercial con modificaciones en la fracción alcohólica son el tetrametrín, el bifentrín y el teflutrín.

La permetrina supuso el siguiente avance en el desarrollo de los piretroides, siendo el primero con suficiente fotoestabilidad como para utilizarse en agricultura. A diferencia de la resmetrina, la permetrina cuenta con modificaciones estructurales tanto en la fracción ácida (los grupos metilos se sustituyen por cloruros) como en la fracción alcohólica (el 5-benzil-3-furilmetil se sustituye por 3-fenoxibenzil), que le confieren mayor estabilidad, sin pérdida de actividad insecticida. Por otro lado, la inclusión de un grupo α -ciano en la fracción alcohólica, como en el deltametrín, dio lugar a compuestos con mayor potencial insecticida que la permetrina, pero con una estabilidad similar (Elliot *et al.*, 1974a). Los piretroides con estructuras relacionadas a las de la permetrina y el deltametrín constituyen la mayor subfamilia química de piretroides en uso actualmente.

La diversidad estructural de los piretroides sintéticos aumentó por el hallazgo de que el ácido 2,2-dimetilciclopropanocarboxílico de las piretrinas y de la mayoría de los compuestos sintéticos podía sustituirse por el ácido α -isopropilfenilacético. De este modo, se sintetizó el insecticida comercial fenvalerato (Ohno *et al.*, 1974). Otras modificaciones en la estructura de la molécula, como sustituciones en el enlace central éster, dieron lugar a compuestos como el etofenprox, que conserva la configuración global de la molécula, junto con la típica actividad insecticida de los piretroides (Figura 2).

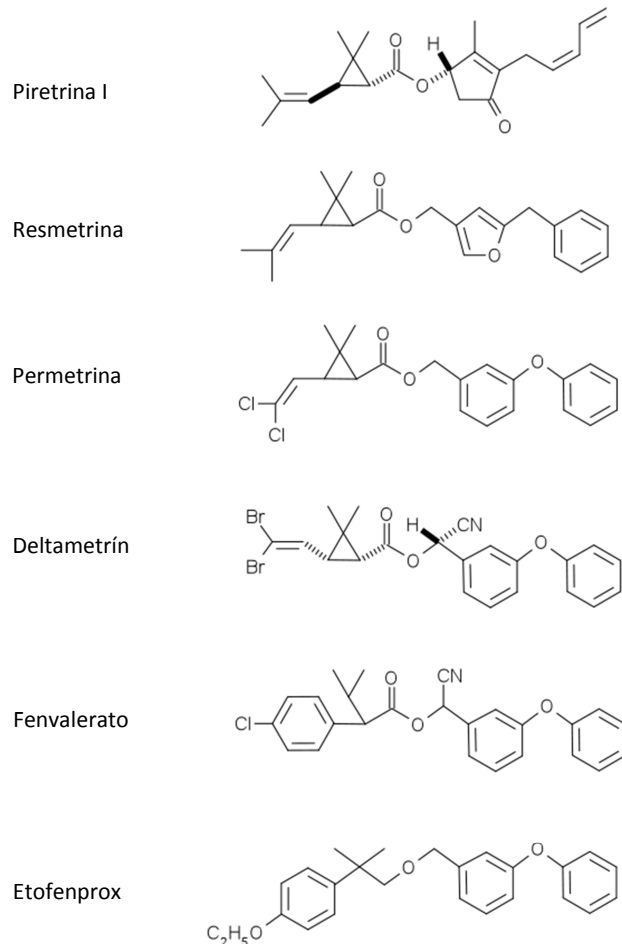


Figura 2. Evolución estructural de los piretroides sintéticos (Soderlund, 2010)

Isomería

A pesar de la amplia diversidad estructural de los piretroides, éstos se ajustan al mismo tipo de actividad insecticida basada en las propiedades físicas, la forma y configuración tridimensional de la molécula completa (Elliot *et al.*, 1974b). Parece, por tanto, que dicha actividad insecticida depende de que la molécula completa encaje de forma adecuada en el sitio de acción.

Como anteriormente hemos señalado, los piretroides están compuestos por distintos grupos estructurales, pero de manera general constan de una fracción ácida, un enlace central éster y una fracción alcohólica. La fracción ácida contiene dos átomos de carbono quirales, lo que significa que los piretroides son compuestos estereoisoméricos (Anadón *et al.*, 2009). De este modo, los centros quirales de los carbonos -1 y -3 del ácido crisantémico de la piretrina I, dan lugar a dos pares de diastereómeros, denominados *trans* y *cis* en función de la orientación de los sustituyentes en C-1 y C-3 en relación al plano del anillo ciclopropano. Las fracciones ácidas de las piretrinas naturales existen exclusivamente en la configuración 1*R*, *trans*. Cuando se sintetizan ésteres de los cuatro isómeros del ácido crisantémico, aquéllos con la configuración *R* en el C-1 del anillo ciclopropano tienen actividad insecticida, mientras que los enantiómeros 1*S* carecen de ella (Elliot *et al.*, 1974b). Esta estereoespecificidad se extiende a otros compuestos, como el fenvalerato, en el que la configuración 2*S* de la fracción ácida no-ciclopropano es estructuralmente congruente con la configuración 1*R* ciclopropanocarboxilato, originando ésteres con actividad insecticida, mientras que los ésteres 2*R* son inactivos.

La estereoisomería es algo menos frecuente en la fracción alcohólica de los piretroides, si bien algunos de estos compuestos poseen un carbono quiral en esta fracción, originando por tanto moléculas de tres carbonos quirales y un total de ocho estereoenantiómeros diferentes. Así, cuando un centro quiral está presente en la fracción alcohólica en el carbono con el grupo hidroxilo, como en las piretrinas y en los ésteres del alcohol α -ciano-3-fenoxibenzil (como en el deltametrín), solo un epímero posee elevada actividad insecticida, incluso si la fracción ácida contiene la configuración estereoquímica apropiada para una alta actividad insecticida (Elliot *et al.*, 1978).

Por tanto, los piretroides pueden poseer de uno a tres centros quirales, dando lugar a entre dos y ocho isómeros, cada uno de ellos con diferente actividad biológica (Figura 3). Solo los ésteres 1*R*-ciclopropanocarboxilato y los isómeros isostéricos 2*S* de los fracción ácida no-ciclopropano son tóxicos. La configuración absoluta en el C-3 ciclopropano de los ésteres ciclopropanocarboxilato con alcoholes primarios también influye fuertemente en la toxicidad. Los compuestos con una configuración 1*R*, *cis* son tóxicos. Además, la presencia de un sustituyente α -ciano en la configuración *S* del alcohol 3-fenoxibenzil, aumenta la toxicidad aguda (Tsuji *et al.*, 2012).

Los piretroides pueden formularse como mezclas racémicas o como isómeros únicos (deltametrín), y algunos isómeros pueden tener nombres individuales reflejando su importancia comercial, como ocurre con la resmetrina (isómeros: bioresmetrina, cisresmetrina), la aletrina (isómeros: d-aletrina, bioaletrina, esbiotrina y s-bioaletrina), el fenvalerato (isómero: fenvalerato), el cihalotrín (isómero: λ -cihalotrín), el fenotrín (isómero: d-fenotrín) y la cipermetrina (isómero: α -cipermetrina) (Aldridge *et al.*, 1978).

Actualmente, la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de los EE.UU. (US EPA) solicita a las empresas que registran productos plaguicidas que proporcionen métodos analíticos apropiados para confirmar su identidad, por lo que ha sido necesario desarrollar métodos de ensayo adecuados para determinar el contenido de isómeros *cis* vs. *trans*.

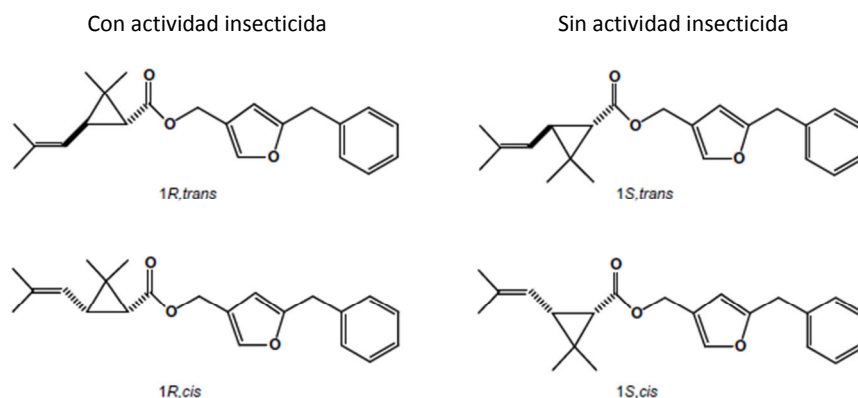


Figura 3. Isómeros con y sin actividad insecticida de la resmetrina (Soderlund, 2010)

3.1.2. Clasificación de los piretroides

Los piretroides están considerados insecticidas relativamente seguros. Sin embargo, la toxicidad aguda de los piretroides en mamíferos varía ampliamente en función de su estructura. La Tabla 1 refleja la toxicidad oral en ratas de varios piretroides registrados actualmente en EE.UU. Salvo excepciones, estos compuestos, con dosis letales 50 (DL₅₀) agudas que oscilan entre un rango de 50 y 500 mg/kg, se consideran moderadamente tóxicos (Categoría II de la USEPA). Sin embargo, cuando los piretroides son administrados a dosis única, el tipo de intoxicación suele ser transitoria, de modo que los animales que sobreviven, se recuperan en aproximadamente 14 días tras recibir tratamiento (Soderlund *et al.*, 2002).

Históricamente, los piretroides se han clasificado en dos subclases, en función del síndrome toxicológico que inducen tras su administración intravenosa u oral en ratas a dosis agudas: denominados *Síndromes T* (tremor en la totalidad del cuerpo) y *CS* (coreoatetosis con salivación) (Verschoyle y Aldridge, 1980). Estos autores observaron que, en líneas generales, el *Síndrome CS* está asociado a los piretroides que poseen un

alcohol α -ciano-3-fenoxibenzil en su estructura. Lawrence y Casida (1982) confirmaron esta observación en 29 piretroides administrados intracerebralmente en ratones. El *Síndrome T* se manifiesta con hipersensibilidad a los estímulos externos y agresividad, seguida de episodios de temblor generalizado, fasciculaciones musculares, postración, coma y muerte (Soderlund, 2010). La elevación de la temperatura corporal se atribuye a la excesiva actividad muscular asociada al temblor (Breckenridge *et al.*, 2009). El *Síndrome CS*, se caracteriza por salivación profusa sin lagrimeo, sacudidas de los miembros del tercio posterior y movimientos involuntarios irregulares (coreoatetosis), y finalmente convulsiones clónicas. El descenso de la temperatura corporal observado en este síndrome se atribuye al exceso de salivación y humedecimiento de la superficie ventral del cuerpo, lo que da lugar a pérdida de calor (Breckenridge *et al.*, 2009).

Compuesto	DL50 (mg/kg)		Clase estructural	Síndrome toxicológico
	Machos	Hembras		
S-bioaletrina	370	320	Tipo I	T
Bifentrín	70	54	Tipo I	-
Ciflutrín	155	160	Tipo II	-
λ -cihalotrín	79	56	Tipo II	-
Cipermetrina	297	372	Tipo II	CS
Deltametrín	95	87	Tipo II	CS
Fenvalerato	87	87	Tipo II	CS
Fenpropatrín	71	67	Tipo II	T /CS
Permetrina	1200	1200	Tipo I	T
Piretrinas	710	320	Tipo I	T
Resmetrina	1695	1640	Tipo I	T
Teflutrín	22	35	Tipo I	-

Tabla 1. Toxicidad aguda oral en ratas, clasificación estructural y signos de intoxicación de varios piretroides (Soderlund, 2010).

Posteriormente, se propuso una nomenclatura alternativa (Tipo I y Tipo II) para diferenciar los piretroides basada no solo en los síndromes toxicológicos que producen en mamíferos, sino también en sus estructuras químicas, los signos de envenenamiento en insectos, y sus acciones en preparaciones nerviosas de insectos (Gammon *et al.*, 1981). Los piretroides Tipo II contienen un alcohol α -ciano-3-fenoxibenzil (como el deltametrín y el fenvalerato), mientras que los piretroides Tipo I constituyen un amplio grupo de compuestos con gran variedad estructural pero que carecen del grupo α -ciano-3-fenoxibenzil (por ejemplo, la piretrina I, la resmetrina y la permetrina).

La nomenclatura Tipo I/Tipo II ha sido ampliamente adoptada en la literatura y frecuentemente se utiliza de forma paralela a la nomenclatura *T/CS*, de modo que generalmente se considera que los compuestos Tipo I producen el *Síndrome T*, y los compuestos Tipo II producen el *Síndrome CS*. Sin embargo, la relación entre los dos síndromes y los tipos parece no confirmarse en todos los piretroides. Por ejemplo, Soderlund *et al.* (2002), revisaron los estudios neurotóxicos de nueve piretroides registrados y concluyeron que: el deltametrín y el ciflutrín producían signos de intoxicación que se ajustaban al *Síndrome CS*, otros producían una mezcla de signos asociados tanto al *Síndrome T* como al *CS* (permetrina, *S*-bioaletrina y pyrethrum), y también observaron en otros la relación de signos que no se correspondían claramente con ninguno de los dos síndromes (bifentrín, cihalotrín y cipermetrina). En esta misma línea, aunque las descripciones iniciales de los *Síndromes T* y *CS* sugerían que los signos de intoxicación eran independientes de la ruta de administración (Verschoyle y Aldridge, 1980) y, que la principal diferencia observada entre la administración oral y la intravenosa era la velocidad de inicio de la intoxicación, nuevos datos revelaron que

esta generalización no puede extenderse a todos los piretroides ni a todas las vías de administración (Soderlund *et al.*, 2002).

En relación a las alteraciones neuroquímicas que se producen como consecuencia de la intoxicación con piretroides, Aldridge *et al.* (1978) evidenciaron en ratas tratadas con deltametrín un descenso significativo en los niveles de acetilcolina en cerebro y cerebelo. Sin embargo, la cismetrina no modificó de manera significativa los niveles de acetilcolina. En esta misma línea, en estudios llevados a cabo con deltametrín y cipermetrina en cerebelo se observaron un aumento de los niveles de guanosina monofosfato cíclico (GMP_C) (Aldridge *et al.*, 1978; Brodie y Aldridge, 1982; Brodie y Opacka, 1987), así como también de aminoácidos neurotransmisores y de metabolitos de monoaminas en cerebro.

Estudios posteriores evidenciaron que el piretroide Tipo I permetrina, a dosis que producen tremor en ratas, incrementa los niveles de aspartato en bulbo raquídeo y cuerpo estriado, de glutamato en bulbo raquídeo, de metabolitos de la serotonina en el hipotálamo, bulbo raquídeo e hipocampo y de metabolitos de la dopamina en el cuerpo estriado (Hudson *et al.*, 1986). De manera similar, la aletrina, la cipermetrina, el fenvalerato y la permetrina incrementan los niveles de los metabolitos de la dopamina en cuerpo estriado (Doherty *et al.*, 1988).

3.1.3. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción primario de los piretroides, tanto en insectos como en mamíferos, es la disrupción estereoespecífica de los canales de sodio voltaje-dependientes en las células nerviosas (Anadón *et al.*, 2006).

Existen evidencias de que los piretroides actúan en otras dianas biológicas además de los canales de sodio, contribuyendo a sus efectos *in vivo*. Un ejemplo de ello es la función que ejercen a través de diferentes isoformas de los canales de calcio voltaje-dependientes favoreciendo así la liberación de neurotransmisores e inducir toxicidad (Hildebrand *et al.*, 2004; Symington y Clark, 2005). También son capaces de bloquear los canales de cloro voltaje-dependientes, lo cual se asocia al exceso de salivación y contribuye al aumento de excitabilidad del sistema nervioso central (SNC). Es poco probable que los efectos en los receptores periféricos tipo benzodiacepina asociados al receptor GABA_A sean directamente responsables de la toxicidad de los piretroides, pero pueden favorecer o aumentar las convulsiones resultantes de los efectos en otras estructuras diana (Ray, 2001). Aunque se han identificado otros posibles puntos de actuación de los piretroides *in vitro* (por ejemplo, los receptores nicotínicos de acetilcolina), parece que estos puntos no juegan un papel esencial en su toxicidad (Ray, 2001).

Efectos en los canales de sodio voltaje-dependientes

Las membranas de todas las células excitables (neuronas, miocitos, células endocrinas y gametos femeninos) tienen canales iónicos voltaje-dependientes responsables de generar potenciales de acción. Estas células reaccionan a los cambios de potencial eléctrico de las

membranas, modificando su permeabilidad. Los canales de sodio voltaje-dependientes son proteínas transmembrana responsables del potencial de acción inicial en las células excitables (Catterall, 2000). Estos canales son miembros de la superfamilia proteica de la que también forman parte los canales de calcio y de potasio (Jan & Jan, 1992). Tanto los canales de sodio como los de calcio están formados por cuatro dominios homólogos, mientras que el canal de potasio es un tetrámero con un solo dominio. El canal de sodio es completamente funcional por sí mismo, a menos que la cinética de apertura y cierre del canal se modifique por acción de otras proteínas. El potencial de acción celular comienza con la despolarización de la membrana. Cuando un estímulo nervioso provoca la despolarización de una determinada región de la membrana celular, provoca la activación (apertura) de los canales de sodio próximos, dando lugar a la entrada de iones de sodio (Na^+) al interior celular, lo que a su vez aumenta la despolarización de la membrana. El potencial de acción trabaja mediante retroalimentación positiva, esto es, una vez que empieza, no son necesarios estímulos adicionales para avanzar. No obstante, un milisegundo después de que el canal se haya activado, la membrana alcanza el potencial de equilibrio para el Na^+ , y el canal se desactiva. En este estado, el poro continúa abierto, pero adquiere una configuración que detiene el flujo de iones al interior de la célula. Después de unos pocos milisegundos más, la membrana se repolariza y el canal se cierra, volviendo finalmente a su configuración en reposo. Todo este proceso se produce en consonancia con otros canales y bombas, como los canales de potasio y la bomba sodio/potasio, que se encargan de restablecer el potencial eléctrico inicial de la célula (Catterall *et al.*, 2003). El correcto funcionamiento de los canales de sodio es esencial para la transmisión del impulso nervioso. Por esta razón, si se altera la transmisión normal del impulso, como sucede al actuar los insecticidas piretroides, el organismo afectado sufre parálisis y finalmente muere.

La estructura de la subunidad α del canal de sodio comprende una única cadena polipeptídica que se organiza en cuatro dominios homólogos (I-IV), conteniendo cada uno de ellos seis hélices transmembrana hidrofóbicas (S1-S6) y un bucle-P (bucle de unión a fosfato) entre S5 y S6. Los segmentos S1-S4 actúan como un módulo sensible a los cambios de voltaje. Como los segmentos S4 están cargados positivamente, y son sensibles a los cambios de potencial, se desplazan a través de la membrana para iniciar la activación del canal en respuesta a la despolarización de la membrana. El poro del canal está formado por los segmentos S5 y S6, y por el bucle P situado entre ellos, que actúa como un filtro de iones selectivo en el medio extracelular de la entrada del poro (Catterall *et al.*, 2003; Goldin, 2003).

Con la repolarización de la membrana, el desplazamiento del enlace S4-S5 presiona sobre las hélices S6 correspondientes, enderezándolas y aproximándolas, constriñendo al poro hasta bloquearlo. Cuando el canal de sodio está cerrado, los sitios de contacto de los piretroides están bloqueados. Esto confirma que los piretroides tienen más afinidad por los canales de sodio cuando están abiertos, y su unión a estos canales parece además estabilizar su configuración abierta. Estos insecticidas, por tanto, inhiben la transición del canal a su estado inactivo y no conductor. Al interactuar con el canal, forman una especie de cuña entre los segmentos IIS5 y IIS6 que restringe el desplazamiento del poro, y evita la reorganización necesaria en la región para cerrar el canal: la fracción ácida del piretroide se une entre las hélices IIS5 y IIS6 y estabiliza la configuración del enlace IIS4-S5, lo que impide su desplazamiento y hace que la hélice IIS6 se mantenga en una conformación doblada congruente con la configuración abierta del poro. A consecuencia de esto, el flujo de Na^+ al interior celular se prolonga y la célula tiene que trabajar en un estado de anormal hiperexcitabilidad. El flujo de iones Na^+ no decrecerá,

a menos que el nivel de hiperexcitabilidad de la célula se debilite gracias a su capacidad para mantener la bomba sodio/potasio operativa. Todo este proceso es el responsable del efecto subletal de los piretroides en los insectos, que provoca convulsiones, parálisis y finalmente la muerte, efecto que se conoce como ‘knockdown’ (Davies *et al.*, 2008), y que los piretroides tienen en común con el insecticida DDT.

A principios de los años 50, tan pronto se introdujo el DDT como insecticida, se describieron cepas de moscas resistentes a él. Cuando se exponían al DDT, estos insectos no sufrían parálisis seguida de la muerte (Knockdown), sino que la mayoría presentaba una parálisis momentánea seguida de una recuperación completa de la locomoción. A este fenotipo se le denominó *kdr* (resistencia *kdr*) (Busvine, 1951). Desde la misma introducción de los piretroides en el mercado, se han observado muchas especies de insectos exhibiendo el fenotipo *kdr*, atribuyéndose a la presión selectiva ejercida previamente por el DDT que dio lugar a la aparición de resistencias cruzadas entre ambos insecticidas (Hemingway *et al.*, 2000). La resistencia *kdr* provoca que la sensibilidad frente a los piretroides descienda de 10 a 20 veces. Asimismo, algunas líneas *kdr* pueden exhibir un incremento de hasta 100 veces la resistencia a los piretroides, efecto denominado *super-kdr*. Los alelos *kdr* y *super-kdr* actúan como caracteres recesivos, y por tanto persisten a bajos niveles en las poblaciones de individuos heterocigóticos (Davies *et al.*, 2007).

La acción de los piretroides sobre los canales de sodio de insectos y otros invertebrados, y la correlación de este efecto junto con su actividad insecticida ha sido ampliamente estudiada (Sattelle y Yamamoto, 1988; Soderlund y Bloomquist, 1989; Bloomquist, 1993; Narahashi, 1992, 1996).

Estudios genéticos sobre los mecanismos de resistencia frente a los piretroides (que implica una disminución de la sensibilidad nerviosa) han confirmado que los canales de sodio voltaje-dependientes constituyen el principal sitio de acción de estos compuestos (Soderlund y Knipple, 1999).

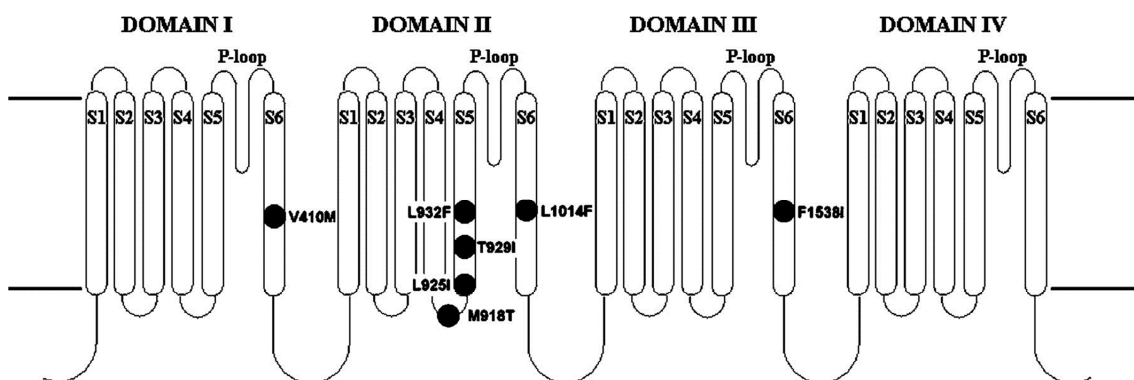


Figura 4. Topología transmembrana del canal de sodio voltaje-dependiente (O'Reilly et al., 2006). La subunidad α del canal consiste en una cadena polipeptídica con cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno de ellos con seis hélices transmembrana (S1-S6). Los dominios parecen formar un poro central acuoso, en los segmentos S5, S6 y en los enlaces S5-S6 (bucles P). En la figura se muestra la identidad y localización de las mutaciones asociadas a *kdr*, con los residuos numerados de acuerdo con la secuencia del canal de sodio voltaje-dependiente de la mosca.

Un estudio en mosca desarrolló un modelo del canal de sodio voltaje-dependiente en su configuración abierta, utilizando como plantilla estructuras cristalinas de canales de potasio voltaje-dependientes homólogos del cerebro de la rata, y ha permitido predecir la localización de los sitios de unión de los piretroides (O'Reilly *et al.*, 2006). El modelo confirma satisfactoriamente el mecanismo de acción de los piretroides y el papel de las mutaciones del canal en la resistencia frente a estos insecticidas. El canal de sodio se modeló en la configuración abierta con los sitios de unión de los insecticidas localizados en una cavidad hidrofóbica delimitada por el enlace IIS4-S5 y las hélices IIS5 y IIS6. Se predijo que esta cavidad era accesible para bicapas lipídicas, y por tanto para insecticidas liposolubles. La unión de éstos y la consiguiente formación de puntos de unión a lo largo de distintos elementos del canal, podría estabilizar el canal cuando

está en su configuración abierta, lo que concuerda con las prolongadas corrientes de cola o de cierre inducidas por los piretroides. En la configuración cerrada, la posición alternativa predicha del enlace IIS4-S5 puede provocar la disrupción de los puntos de contacto de los piretroides, lo que es congruente con la observación de que los piretroides tienen su máxima afinidad por el canal cuando éste está abierto. Se confirmó también la importancia de la forma global de la molécula en la acción de los piretroides, y la estricta estereoespecificidad necesaria para poseer actividad insecticida, puesto que son decisivas a la hora de acomodar a los piretroides a los puntos de unión del canal. Así, mientras la fracción ácida tolera más tipos de sustituciones, la región central del piretroide próxima al enlace éster es especialmente importante en la asociación a los sitios de unión del canal, y la sustitución de dicho enlace con otros grupos siempre conlleva una pérdida sustancial de actividad, salvo que el grupo sustituido conserve la configuración global de la molécula (como en el caso del piretroide no tipo éster etofenprox). A su vez, un requisito primordial para la unión del piretroide parece ser la correspondencia entre el volumen de la fracción alcohólica y la cavidad hidrofóbica formada por el enlace S4-S5 y el segmento S5 del dominio II del canal de sodio, así como la óptima disposición espacial de los anillos aromáticos del alcohol. El modelo también predice el papel clave de las hélices IIS5 y IIS6 en la unión del insecticida, puesto que algunos de los residuos de esas hélices que forman los aparentes sitios de unión no se conservan entre especies artrópodos y no artrópodos, contribuyendo a la selectividad de los piretroides por los insectos. Finalmente, el estudio respalda la existencia de puntos de unión exclusivos para los piretroides Tipo I y Tipo II, lo que explicaría su diferente mecanismo de acción sobre el canal de sodio.

Registros intracelulares de los potenciales de acción demostraron que los piretroides pueden producir dos tipos distintos de efectos sobre la excitabilidad del nervio,

dependiendo de la estructura química del piretroide empleado (Lund y Narahashi, 1983). Los piretroides Tipo I producen múltiples descargas repetitivas de potenciales de acción a partir de un solo estímulo con poco o ningún efecto sobre el potencial de reposo. Los piretroides Tipo II no inducen descargas repetitivas, sino que causan un bloqueo uso-dependiente del potencial de acción (su acción bloqueante se facilita por el incremento en la frecuencia de apertura del canal, pues cuantos más receptores estén abiertos, más podrán ser bloqueados) unido a la despolarización del potencial de reposo. Algunos compuestos exhiben propiedades intermedias, provocando descargas de amplitud decreciente que finalmente originan la despolarización del nervio y su bloqueo. Técnicas como el *patch clamp* han permitido dilucidar los efectos de los piretroides en la actividad del canal de sodio que subyacen a las acciones descritas sobre la excitabilidad del nervio. Mediante *patch clamp* se vio que todos los piretroides neuroactivos retardan la cinética de activación, inactivación y desactivación del canal de sodio (Bloomquist, 1993; Narahashi, 1996). Esta ralentización es evidente durante la etapa de despolarización (cuando se induce una lenta pero persistente corriente de sodio), y después de la repolarización (cuando se produce un lento declive de la corriente de cola o de cierre). Mientras que los piretroides Tipo I originan corrientes de cola que decaen relativamente rápido, los compuestos Tipo II producen corrientes de cola extremadamente persistentes, lo que se traduce en que los piretroides Tipo II retrasan la inactivación del canal por un período de tiempo mucho mayor que el Tipo I. En estudios realizados con la técnica del pinzamiento zonal de membranas, el compuesto Tipo I tetrametrín aumenta el tiempo medio de apertura del canal de sodio en 10 veces, aproximadamente. Los compuestos Tipo II deltametrín y fenvalerato aumentan el tiempo medio de apertura de los canales de sodio hasta 200 veces, y provocan que el canal permanezca abierto al final de los pulsos de despolarización. El

deltametrín también retrasa la apertura del canal en respuesta a un pulso despolarizante. Estos hallazgos se han interpretado como evidencias de que los piretroides estabilizan múltiples estados del canal de sodio, y enlentecen los períodos transitorios entre dichos estados. El estudio de O'Reilly *et al.* (2006), postuló que la presencia del grupo α -ciano en los piretroides Tipo II es fundamental en el sustancial retraso de la inactivación del canal de sodio que estos compuestos causan. Los piretroides α -ciano tienen la capacidad de formar un enlace de hidrógeno entre el protón del carbono α , el éster del grupo carbonilo y el grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido Thr⁹²⁹ del canal de sodio. Además, la posición del protón α es también clave en la interacción del alcohol 3-fenoxibenzil de estos piretroides, porque proporciona un punto de contacto adicional con el canal de sodio, solo en presencia de un anillo aromático en la posición meta. Esta interacción sería la responsable de las diferencias en el tiempo de apertura del canal de sodio entre los piretroides Tipo I y II, así como del aumento de eficacia insecticida de compuestos como el deltametrín y el fenvalerato.

Existen evidencias de que los canales de sodio voltaje-dependientes son también importantes sitios diana en mamíferos. A diferencia de los insectos, los mamíferos cuentan con varias isoformas del canal de sodio que varían en su distribución tisular y en sus propiedades biofísicas y farmacológicas, incluyendo la sensibilidad a algunos o a todos los piretroides (Goldin, 1999). Por lo tanto, no es apropiado considerar al canal de sodio de los mamíferos como una única, farmacológicamente homogénea diana para los piretroides (Soderlund *et al.*, 2002).

La mayor parte de la información disponible sobre las acciones de los piretroides en los canales de sodio de los mamíferos se obtuvo usando preparaciones de tejido neuronal,

en las que se expresan múltiples isoformas de estos canales. Como resultado, la acción ejercida por los piretroides no ha sido correlacionada con la expresión de isoformas identificadas de los canales de sodio en estos tejidos. Sin embargo, un número limitado de estudios sugiere que estas isoformas, expresadas en varios tejidos, muestran diferente sensibilidad a los piretroides. La evidencia más clara de esta diferente sensibilidad se encontró en las respuestas a los piretroides de poblaciones con canales de sodio TTX-sensibles (tetrodotoxina-sensibles) y TTX-resistentes (tetrodotoxina-resistentes) en las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG). La tetrodotoxina (TTX) es una potente neurotoxina que se encuentra principalmente en el hígado de algunos peces y que actúa bloqueando los canales de sodio de las células. En las neuronas de la DRG, la corriente TTX-resistente es mucho más sensible que la corriente TTX-sensible a la aletrina (Ginsburg y Narahashi, 1993), el tetrametrín (Song *et al.*, 1996) y el deltametrín (Tabarean y Narahashi, 1998).

Las subunidades α que forman el poro de los canales de sodio voltaje-dependientes en mamíferos están codificadas por una familia de nueve genes (Catterall *et al.*, 2005a), a diferencia de los insectos, que parecen tener un único gen para la subunidad α del canal de sodio. Estos canales en mamíferos, designados $\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$, se distribuyen de distinta manera en las células excitables, y tienen propiedades funcionales y farmacológicas exclusivas. Las isoformas $\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$ y $\text{Na}_v1.6$ se expresan en el SNC (Goldin, 2001) y representan dianas potenciales para las acciones neurotóxicas de los piretroides. En la mayoría de los casos, las subunidades α se expresan conjuntamente con una o dos subunidades auxiliares β , que modulan la apertura y cierre del canal, así como su cinética, y además regulan la expresión del canal (Meadows y Isom, 2005). En mamíferos hay cuatro subunidades β en los canales de

sodio, llamadas $\beta 1$ - $\beta 4$. Normalmente, una sola neurona expresa múltiples subunidades α y β , y por tanto puede contener varios complejos heteromultímeros distintos.

La información disponible relativa a la sensibilidad individual de cada una de las isoformas de los canales de sodio en mamíferos frente a los piretroides se ha obtenido principalmente mediante sistemas de expresión heteróloga, clonando individualmente cada isoforma en oocitos no fertilizados de la rana *Xenopus laevis*, o mediante transfección en líneas celulares de mamíferos. Estudios realizados con el sistema de oocitos de *Xenopus* han puesto de manifiesto que, en la rata, los canales de sodio Nav1.2 (abundantes en el SNC de adultos) muestran una sensibilidad muy baja al deltametrín y otros piretroides (Vais *et al.*, 2000). Por el contrario, los canales Nav1.8, que son resistentes al bloqueo de la tetrodotoxina y cuya distribución se restringe al sistema nervioso periférico (SNP), son sensibles a una gran variedad estructural de piretroides (Choi y Soderlund, 2006; Smith y Soderlund, 2001; Soderlund y Lee, 2001). La isoforma Nav1.3 es mucho más sensible a los piretroides Tipo II que la isoforma Nav1.2 (Meacham *et al.*, 2008; Tan y Soderlund, 2009). La sensibilidad que manifiesta la isoforma Nav1.3 es de interés especial, porque se expresa preferentemente en el SNC del embrión de los roedores y en sus primeras fases postnatales, y pueden por tanto tener un papel importante en el desarrollo de los efectos neurotóxicos atribuidos a piretroides (Shafer *et al.*, 2005). Estudios preliminares sugieren que la isoforma Nav1.6, la más abundante en el cerebro adulto, es también sustancialmente más sensible a los piretroides que la isoforma Nav1.2 (Tan *et al.*, 2008).

Los genes que codifican las subunidades α de los canales de sodio tienen un alto grado de conservación entre taxones animales, de modo que subunidades ortólogas en las ratas

y humanos son idénticas a nivel de la secuencia aminoacídica en más del 95% (Goldin, 2001). Sin embargo, esto conlleva una diferencia de entre 50-100 aminoácidos entre proteínas ortólogas, lo que posiblemente origine diferencias interespecies en las propiedades funcionales y farmacológicas del canal. El sistema de expresión heteróloga ofrece la oportunidad de comparar directamente la sensibilidad frente a piretroides de los canales ortólogos de sodio de la rata y el ser humano. El primer estudio al respecto comparó la sensibilidad de los canales ortólogos Nav1.3, que difieren solo en 54 de los 1951 aminoácidos que los componen (Tan y Soderlund, 2009). Sorprendentemente, los canales Nav1.3 de humana fueron significativamente menos sensibles al teflutrín que los de la rata. Estos resultados comportan importantes implicaciones para la comprensión del valor y de las limitaciones que los estudios toxicológicos en ratas tienen en la evaluación del riesgo en humanos.

Varios estudios recientes sobre las isoformas individuales del canal de sodio de la rata expresadas en oocitos han evaluado el impacto de los piretroides en la activación del canal. La información disponible relativa a las modificaciones dependientes del estado de las isoformas del canal expresadas en el SNC se limita sobre todo a dos compuestos, el deltametrín (Tipo II) y el teflutrín (Tipo I). Estudios realizados con las isoformas Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6 de la rata expresadas en oocitos han identificado efectos distintos y constantes del teflutrín y del deltametrín, que son independientes de la sensibilidad de estas isoformas a los piretroides (Tan y Soderlund, 2009, 2010). Los resultados de estos estudios sugieren que las modificaciones uso-dependientes de las isoformas del canal de sodio en el cerebro varían de un compuesto a otro, pero parecen ser relativamente constantes entre las isoformas e independientes de la sensibilidad total de estas isoformas frente a los piretroides.

Efectos sobre los canales de calcio voltaje-dependientes.

Los canales de calcio voltaje-dependientes modulan una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la liberación de neurotransmisores, ajustes metabólicos, proliferación celular, contracción, y/o el control de la expresión génica entre otros. Son complejos proteicos hetero-oligoméricos compuestos de subunidades estructuralmente diferentes (α_1 , α_2 , β , γ , δ), siendo la subunidad α_1 la que forma el poro conductor de iones del canal (Catterall *et al.*, 2005b). Se han identificado varias clases de canales de calcio en base a sus propiedades biofísicas, electrofisiológicas y farmacológicas. Una importante diferencia biofísica entre ellos es aquélla por la que ciertos canales se activan solo por pequeñas despolarizaciones (activación por bajo voltaje), mientras que otros se activan solamente por despolarizaciones mayores (activación por alto voltaje). Los canales que se activan a altos voltajes se subdividen de acuerdo con su distribución tisular y sus propiedades físicas y farmacológicas en cinco tipos (L, N, Q, P, y R), mientras que los que se activan a bajos voltajes están englobados en un único tipo (T). Las distintas clases funcionales de los canales de calcio se corresponden con las subcategorías de los 10 genes conocidos para la subunidad α_1 (Catterall *et al.*, 2005b).

Posiblemente, los efectos de los piretroides sobre los canales de calcio voltaje-dependientes expliquen el aumento en la liberación de neurotransmisores que se produce en el SNC durante el *Síndrome toxicológico CS* (Soderlund *et al.*, 2002). Los primeros hallazgos *in vitro* que establecieron la acción directa de los piretroides sobre la liberación espontánea de neurotransmisores se obtuvieron usando terminales nerviosas presinápticas (sinaptosomas) aisladas de la corteza cerebral de cobayas (Nicholson *et al.*, 1987). Tanto el deltametrín como la permetrina aumentaron esta liberación espontánea, siendo el deltametrín más potente. Posteriormente, se repitieron los mismos

resultados con 25 piretroides en sinaptosomas cerebrales de ratas (Doherty *et al.*, 1986, 1987). La liberación provocada por los piretroides era bloqueada solo parcialmente por TTX o sustituyendo colina por sodio, lo que indicaba que los piretroides ejercían alguna acción en otro lugar además del canal de sodio. Se ha observado que el fenvalerato, la cipermetrina y el deltametrín también incrementan la liberación calcio-dependiente de dopamina y acetilcolina en el cuerpo estriado del encéfalo del conejo (Eells y Dubocovich, 1988), siendo esta liberación dependiente de la concentración, y específica de los isómeros neurotóxicos de estos piretroides. En el caso concreto del fenvalerato, la liberación fue totalmente bloqueada por la TTX, lo que parece excluir una acción directa sobre los canales de calcio como mecanismo para aumentar la liberación de estos neurotransmisores, al menos en los ensayos sobre el cuerpo estriado. El aumento en la liberación de neurotransmisores inducido por los piretroides también se observa tras la despolarización de los terminales nerviosos. Tratamientos con deltametrín, cipermetrina y fenvalerato incrementan considerablemente la liberación de neurotransmisores calcio dependientes siguiendo la despolarización por potasio (K^+) de los sinaptosomas cerebrales de la rata (Brooks y Clark, 1987). La liberación inducida por deltametrín está fuertemente correlacionada con la captación de calcio (Ca_2^+) y solo es parcialmente bloqueada por la TTX (Clark y Brooks, 1989a). Sin embargo, la liberación se ve completamente bloqueada por la D595, una potente fenetilamina bloqueante del canal de calcio (Brooks y Clark, 1987).

En relación al aumento en la liberación de neurotransmisores inducido por piretroides existe cierta controversia. En algunos casos, la liberación se inhibía totalmente por acción de la TTX, y por tanto se atribuía a una acción sobre los canales de sodio voltaje-dependientes, pero en otros casos, la liberación inducida por los piretroides, era

parcialmente insensible a la TTX, correlacionándose con la captación de calcio, atribuyéndose por tanto a un efecto directo de los piretroides sobre los canales de calcio voltaje-dependientes.

Estudios llevados a cabo en sinaptosomas cerebrales de rata nos ofrecen una visión más completa de la acción de los piretroides sobre la captación de calcio y la despolarización nerviosa seguida por la liberación de neurotransmisores (Symington *et al.*, 2007a, 2008). En estos estudios, se trabajó con 11 piretroides comercialmente disponibles, tanto del Tipo I como del Tipo II, e inductores tanto del *Síndrome T* como del *CS*. Cinco de los seis compuestos Tipo II estudiados (ciflutrín, cialotrín, cipermetrina, deltametrín y fenvalerato) y la permetrina (Tipo I) fueron potentes estimuladores de la captación de calcio y de la liberación de neurotransmisores. En el caso del deltametrín, ambos efectos se vieron inhibidos por la ω -conotoxina MVIIC (neurotoxina producida por el caracol marino *Conus magus*), un bloqueante selectivo de los canales de calcio tipo N. Los cinco piretroides restantes fueron mucho menos potentes en ambos ensayos (cismetrín y bifentrín) o aumentaron la liberación de glutamato sin el correspondiente aumento del flujo de calcio (bioaletrina, fenpropatrín y teflutrín). Dado que ambos estudios se realizaron en presencia de TTX para eliminar los efectos sobre los canales de sodio, estos resultados ponen de manifiesto que al menos algunos piretroides estimulan directamente la despolarización, aumentando así la captación de calcio y la liberación de neurotransmisores en terminaciones presinápticas cerebrales. Este sistema se ha utilizado para caracterizar la acción conjunta de piretroides (Symington *et al.*, 2011), y se ha observado que la existencia de efectos sinérgicos sobre la liberación de neurotransmisores, en ausencia de los correspondientes efectos sinérgicos sobre la captación de calcio, puede interpretarse como una prueba de la existencia de un tercer

mecanismo de acción (además de las acciones sobre los canales de sodio y calcio) que contribuya a los efectos ejercidos por un subgrupo de piretroides sobre la liberación de neurotransmisores.

Los ensayos realizados sobre la captación de calcio inducida por piretroides en cultivos neuronales de ratón (Cao *et al.*, 2011) no han podido confirmar que se produzca una acción directa de los piretroides sobre los canales de calcio voltaje-dependientes. En este sistema, nueve de los once piretroides estudiados produjeron un aumento del calcio intracelular dependiente de la concentración del piretroide, que se inhibía por completo por la presencia de TTX, concluyendo por tanto que se trataba de un efecto secundario sobre el flujo de entrada del calcio como resultado de la activación de los canales de sodio voltaje-dependientes. Ensayos realizados con teflutrín y deltametrín, en los que se emplearon bloqueantes específicos de las rutas de entrada del calcio, pusieron de manifiesto la existencia de un flujo de entrada de calcio secundario mediado por receptores de *N*-metil-D-aspartato (NMDA) (presumiblemente por la liberación de glutamato inducida por la despolarización), por canales de calcio tipo L, y por el intercambiador sodio/calcio operando a la inversa (Soderlund, 2012).

Por otro lado, estudios electrofisiológicos *in vitro* realizados mediante *patch clamp* pusieron de manifiesto que el tetrametrín (Tipo I) bloquea selectivamente las corrientes de calcio mediadas por los canales tipo T (75%), sin tener apenas efecto sobre los canales tipo L (30%) en neuroblastomas de ratón (Yoshii *et al.*, 1985). En cambio, no se observó ningún efecto del deltametrín y del fenvalerato (Tipo II) sobre ninguna de las dos corrientes de calcio (Yoshii *et al.*, 1985). Se han obtenido resultados similares en ensayos sobre células del nodo sinoatrial del corazón de conejo (Hagiwara *et al.*, 1988) y sobre células del músculo liso del intestino de cobaya (Yabu *et al.*, 1989). Estudios

posteriores con células neurosecretoras demostraron que el teflutrín (Tipo I) produce una inhibición parcial de las corrientes de calcio tipo L a concentraciones que también causan la modificación de las corrientes de sodio en estas células (Wu *et al.*, 2009).

También se han llevado a cabo ensayos sobre los efectos de los piretroides sobre isoformas de canales de calcio expresadas tanto en oocitos de *Xenopus* como en células HEK (células embrionarias humanas del riñón). Hildebrand *et al.*, (2004) demostraron que la aletrina era igual de efectiva como bloqueante de las isoformas de los canales de calcio T, L o P/Q expresadas en células HEK. En los tres tipos de canales, el bloqueo se acompañó de un aumento en la tasa de inactivación del canal y un cambio de la inactivación voltaje-dependiente desplazándose hacia potenciales más negativos. Adicionalmente, el bloqueo de los canales tipo L y P/Q aumentó por estimulación repetida, mientras que el bloqueo de los canales tipo T no se vio afectado. De forma similar, Symington y Clark (2005) demostraron que el deltametrín causaba el bloqueo parcial de la isoforma tipo N de los canales de calcio expresada en oocitos de *Xenopus*: en contraste con lo ocurrido en los canales de calcio expresados en células HEK, el bloqueo ejercido por este piretroide en los canales tipo N de los oocitos se acompañaba de un ligero cambio hiperpolarizante de la activación voltaje-dependiente, y de un enlentecimiento de la activación e inactivación del canal. La inserción de la mutación T422E en el canal de calcio Cav2.2 (tipo N) revierte los efectos del deltametrín, provocando un incremento significativo del pico temporal de la corriente de calcio del canal mutado (Symington *et al.*, 2007b). La mutación T422E simula la fosforilación completa del residuo treonina-422, lo que sugiere que el deltametrín puede influir en la regulación de los canales de calcio. Estudios usando un activador de la proteína quinasa C (PKC) para aumentar la duración de la fosforilación del canal en oocitos, confirmaron

la elevación de la corriente de calcio en $\text{Ca}_v2.2$ por efecto del deltametrín siguiendo la activación de PKC (Alves *et al.*, 2010).

En resumen, los estudios realizados sugieren que existen evidencias de la capacidad de los piretroides para modificar la funcionalidad de los canales de calcio voltaje-dependientes tanto en su medio original como en sistemas de expresión heteróloga. Los estudios en sinaptosomas muestran los efectos directos de los piretroides sobre el flujo de entrada del calcio y la liberación de neurotransmisores inducidos por la despolarización del canal, que son independientes de las acciones sobre los canales de sodio. Sin embargo, estudios con cultivos neuronales demuestran que la captación de calcio inducida por los piretroides es una consecuencia secundaria a las acciones sobre los canales de sodio. Actualmente aún no está claro si las acciones de los piretroides sobre los canales de calcio en los ensayos realizados en sinaptosomas son significativas si los efectos de los canales de sodio no están bloqueados. Por otro lado, el efecto más observado en los estudios electrofisiológicos es la inhibición de los canales de calcio, lo que no es congruente con la hipótesis de que los efectos directos sobre los canales de calcio de las terminaciones nerviosas aumentan la captación de calcio y la liberación de neurotransmisores. Sin embargo, dos hallazgos recientes proporcionan evidencias de la activación del canal de calcio. En primer lugar, en las células PC12 los piretroides activan selectivamente una corriente atribuida a los canales tipo L, pero bloquean la corriente atribuida a los canales tipo N. En segundo lugar, los estudios realizados en oocitos de *Xenopus* con $\text{Ca}_v2.2$, una isoforma del canal de calcio tipo N, indican que las modificaciones provocadas por los piretroides pueden ser tanto de inhibición como de activación dependiendo del estado de fosforilación del canal. A pesar de todas estas evidencias, la importancia toxicológica de los efectos de los piretroides sobre los

canales de calcio requiere de estudios en mayor profundidad. No hay una conexión clara entre los efectos observados *in vitro* sobre los canales de calcio y la intoxicación por piretroides. Por lo tanto, aunque los efectos sobre los canales de calcio puedan contribuir de alguna forma a la acción de algunos piretroides, no existe una base que permita identificar estos efectos sobre los canales de calcio esenciales en el mecanismo de intoxicación de los piretroides (Soderlund, 2012).

Efectos en los canales de cloro voltaje-dependientes.

Los canales de cloro voltaje-dependientes son un grupo estructuralmente diverso y ampliamente distribuido de proteínas celulares de membrana (Gelband *et al.*, 1996; Jentsch, 1996; Jentsch *et al.*, 1999). La clonación molecular ha permitido diferenciar dos tipos estructurales de canales de cloro. Los canales de cloro de la clase CLC, están implicados en la estabilización del potencial de reposo de membrana, el transporte transepitelial, y la regulación del volumen celular en todo tipo de células (Jentsch *et al.*, 2001). La segunda clase estructural se ejemplifica por el regulador transmembrana de conductividad de la fibrosis quística (CFTR), una proteína celular de membrana que regula la conductividad del cloro en células epiteliales y que en un primer momento se identificó como el *locus* molecular de los defectos genéticos que causan la fibrosis quística (Gelband *et al.*, 1996; Jentsch, 1996). La farmacología de los canales de cloro voltaje-dependientes está poco caracterizada por la falta de ligandos de alta afinidad específicos para estas proteínas (Gelband *et al.*, 1996).

Estudios electrofisiológicos relativos a la acción del cismetrín (Tipo I) y el deltametrín (Tipo II) sobre el músculo esquelético demostraron que el deltametrín (pero no el cismetrín) incrementaba la resistencia a la conductividad de la membrana en el músculo,

y se sugirió que se debía al bloqueo de la permeabilidad del cloro (Cl^-) en la membrana muscular (Forshaw *et al.*, 1987). Posteriormente, otro estudio confirmó este efecto del deltametrín sobre las fibras musculares del diafragma de la rata, y puso de manifiesto que una reducción de la concentración iónica del cloro extracelular lo evitaba (Forshaw y Ray, 1990). Ensayos realizados con la técnica de pinzamiento zonal de membranas en canales de cloro neuronales del neuroblastoma N1E-115 documentaron el bloqueo de la conductividad del canal por acción del deltametrín y la cipermetrina, pero no del cismetrín (Forshaw *et al.*, 1993; Ray *et al.*, 1997). Estos resultados parecen sugerir que el bloqueo del canal de cloro por acción de los piretroides Tipo II contribuye al *Síndrome toxicológico CS*.

Por otro lado, estudios *in vivo* de las interacciones entre los piretroides y determinados agentes que actúan sobre los canales de cloro voltaje-dependientes han proporcionado más información sobre la acción de estos insecticidas sobre los canales de cloro. Durante estos estudios se llevó a cabo la administración conjunta de deltametrín con ivermectina (que se sabe activa los canales de cloro voltaje-dependientes y que tiene acceso limitado al SNC), pentobarbital (barbitúrico que activa selectivamente los canales de cloro) y fenobarbital (que posee efectos sedativos típicos de los barbitúricos sin activar los canales de cloro) (Forshaw *et al.*, 2000; Ray *et al.*, 1999). También se examinaron los efectos de los barbitúricos sobre la intoxicación por cismetrín, un piretroide sin efectos demostrables *in vitro* sobre los canales de cloro voltaje-dependientes (Forshaw *et al.*, 1987; Forshaw y Ray, 1990). Tanto la ivermectina como el pentobarbital, que activan selectivamente los canales de cloro, antagonizan los signos de intoxicación del deltametrín y reducen la incidencia de letalidad a las dosis empleadas, pero no afectan a la intoxicación por cismetrín. Los efectos de estos dos

agentes reduciendo la salivación y los signos motores de intoxicación por deltametrín parecen deberse a su antagonismo a la acción del piretroide en los canales de cloro periféricos y del SNC. Así, los resultados sugieren de nuevo que la acción de los piretroides Tipo II sobre los canales de cloro voltaje-dependientes pueden contribuir al desarrollo de algunos de los signos de intoxicación asociados al *Síndrome CS*.

Sin embargo, un estudio posterior de Burr y Ray, (2004) evaluó la relación entre la estructura química de 14 piretroides que provocan el *Síndrome T* o el *CS*, y su actividad bloqueante de los canales de cloro en células del neuroblastoma N1E-115, y los resultados no pudieron confirmar la correlación entre el bloqueo de los canales de cloro y el *Síndrome toxicológico CS*. El fenvalerato y λ -cialotrin, piretroides Tipo II de los que se esperaba produjeran el *Síndrome CS*, no tuvieron ningún efecto sobre los canales de cloro, mientras que la bioaletrina, un compuesto Tipo I que produce el *Síndrome T*, bloqueó los canales de cloro. A pesar del limitado número de piretroides evaluados, los resultados de este estudio sugieren que los efectos sobre los canales de cloro pueden contribuir a la aparición de los signos de intoxicación asociados al *Síndrome CS* para el caso de ciertos piretroides, pero no parece probable que sean la causa primaria de estos signos para todos los compuestos, es decir, las diferencias de acción de los piretroides Tipo I y Tipo II sobre los canales de cloro no pueden, por sí mismas, ser las responsables de las diferencias entre los dos síndromes toxicológicos.

Otros ensayos (Borg *et al.*, 2002; Culliford *et al.*, 2004; Borg *et al.*, 2007) han puesto de manifiesto la modulación selectiva que ejercen los piretroides en las conductancias cardíacas del cloro, identificando así todo un conjunto de nuevas acciones de estos insecticidas sobre los canales de cloro. Estos efectos incluyen tanto activación como

inactivación de distintas conductancias del cloro por el mismo piretroide, en al menos un caso (fenpropatrín). Los efectos selectivos de los piretroides sobre los mecanismos de transporte del cloro indican que éstos pueden ser valiosas sondas para la investigación farmacológica de estos procesos, pero no existe evidencia de que alguno de estos efectos sobre las conductancias cardíacas del cloro juegue un papel significativo en la intoxicación por piretroides.

Efectos en los receptores GABA

El complejo receptor GABA (ácido γ -aminobutírico)-ionóforo del cloro (receptor GABA_A) es una proteína constituida por cinco subunidades, ensambladas formando un canal en su interior, que atraviesa la membrana neuronal. Es un importante mediador de la neurotransmisión inhibitoria en el sistema nervioso de los mamíferos (McDonald y Olsen, 1994). Las terminaciones nerviosas presinápticas liberan GABA, que activa los canales de cloro de la membrana postsináptica dando lugar a la hiperpolarización de las terminaciones nerviosas postsinápticas. Esto conlleva un aumento de la cantidad de estimulación excitatoria necesaria en esas terminaciones para excitar la neurona postsináptica. Los receptores GABA_A son importantes dianas para la acción de varias clases de sustancias terapéuticas y tóxicas (Johnston, 1996). El etanol, los barbitúricos y las benzodiacepinas modifican alostéricamente la acción del GABA. Los bloqueantes de los canales de cloro, como la picrotoxina y determinados insecticidas sintéticos tales como los ciclodienos clorados (dieldrín, endosulfán, etc.) (Bloomquist, 1998) y los fenilpirazoles (fipronil) (Hosie *et al.*, 1995), actúan como convulsionantes al bloquear los efectos inhibitorios del GABA y producir un aumento indirecto de la neurotransmisión excitatoria (Figura 5).

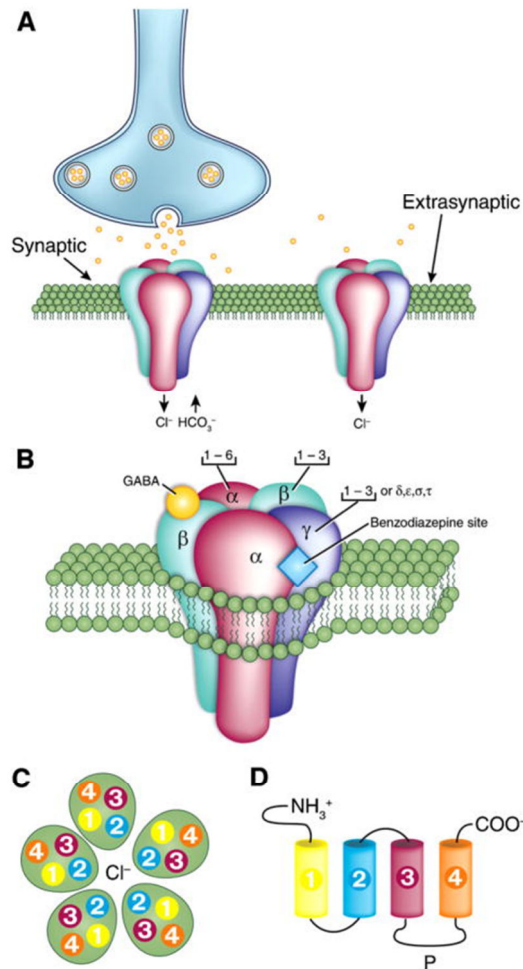


Figura 5. Estructura molecular del receptor ionotrópico GABA_A (Avoli y Curtis, 2011). (A) Localización de los receptores GABA_A en la membrana de la neurona postsináptica. Se muestra un receptor sináptico y un receptor extra- o perisináptico. (B) Estructura del receptor GABA_A y sus subunidades; el canal permeable de Cl⁻ está compuesto por cinco subunidades. Nótese que los receptores compuestos por las subunidades α (1-3) junto con β y γ presumiblemente se localizan sinápticamente, mientras que aquéllos que contienen $\alpha 5$, β y γ se localizan en puntos extrasinápticos. Nótese que la unión de GABA ocurre en la interfaz entre las subunidades α y β mientras que las uniones de las benzodiazepinas ocurren en la interfaz entre las subunidades α (1, 2, 3 o 5) y γ . (C) Vista aérea del receptor GABA_A. Nótese que cada subunidad comprende cuatro dominios transmembrana hidrofóbicos (TM1-TM4) con TM2 alineado con el poro del Cl⁻. (D) Vista desplegada de los dominios transmembrana (TM1-TM4). Nótese que: (i) el grupo amino extracelular terminal es el sitio de unión para el GABA, y también contiene sitios de unión para drogas psicoactivas como las; (ii) el bucle intracelular entre TM3 y TM4 (P) es el sitio de unión para varias proteínas y para varios factores post-transcripcionales que modulan la actividad del receptor.

Se han publicado una gran cantidad de estudios bioquímicos *in vitro* documentando la capacidad de los piretroides que contienen el grupo α -ciano para unirse y bloquear los receptores GABA_A en preparados cerebrales de mamíferos (Leeb-Lundberg y Olsen, 1980; Lawrence y Casida, 1983; Lawrence *et al.*, 1985; Abalis *et al.*, 1986; Bloomquist *et al.*, 1986; Bloomquist y Soderlund, 1985; Ramadan *et al.*, 1988a). El bloqueo de los

receptores GABA_A tiene un efecto neuroexcitatorio indirecto, y es el modo de acción de ciertos convulsionantes como la picrotoxina. Desde un punto de vista funcional, esta acción sobre los receptores GABA_A se corresponde con los signos neuroexcitatorios de la intoxicación *in vivo* de los piretroides.

El primer estudio de la interacción de los piretroides sobre los receptores GABA_A demostró la inhibición estereoespecífica producida por el deltametrín (pero no por su epímero α -R no tóxico) sobre la unión de la [³H]dihidropicrotoxina al canal de cloro de los receptores GABA_A en el cerebro de la rata (efecto proconvulsivante) (Leeb-Lundberg y Olsen, 1980). El posterior desarrollo de la molécula [³⁵S]TBPS como radioligando del canal de cloro acoplado al receptor GABA_A, permitió documentar mejor la interacción de los piretroides con dicho canal de cloro proconvulsionante (Lawrence y Casida, 1983; Lawrence *et al.*, 1985). En estos estudios se observaron los efectos inhibitorios sobre la unión de [³⁵S]TBPS ejercidos por los isómeros tóxicos de cuatro piretroides que contienen la fracción α -ciano-3-fenoxibencil (cipermetrina, deltametrín, fenvalerato y fluvalinato) y por las mezclas isoméricas de otros dos compuestos α -ciano (cifenotrín y fenpropatrín), pero no por los isómeros no tóxicos de los compuestos α -ciano ni por ningún piretroide que carezca del grupo α -ciano, lo que originó la hipótesis de que los piretroides α -ciano (Tipo II) eran responsables del *Síndrome toxicológico CS* por su acción sobre complejo receptor GABA-ionóforo del cloro. Sin embargo, la estereoespecificidad absoluta que estos ensayos parecían demostrar se contradijo con el hallazgo de que el isómero 1*S*, *cis*, α *S* de la cipermetrina, que tiene una baja toxicidad aguda en mamíferos y producía una inhibición significativa de la unión de [³⁵S]TBPS con los receptores GABA_A en el cerebro de la rata (Seifert y Casida, 1985). Estudios posteriores confirmaron la acción de los isómeros neurotóxicos

de los piretroides α -ciano como antagonistas de los receptores cerebrales GABA_A en mamíferos (Abalis *et al.*, 1986, Bloomquist *et al.*, 1986, Bloomquist y Soderlund, 1985; Ramadan *et al.*, 1988a). No obstante, la inhibición de la captación de cloro en estos estudios era incompleta a las concentraciones más efectivas de los piretroides. Además, la incompleta estereoespecificidad de la acción de los piretroides sobre los receptores GABA_A en estos ensayos se contradecía con la profunda estereoespecificidad de la toxicidad de los piretroides (por ejemplo, el enantiómero del deltametrín, que es unas 500 veces menos tóxico que el propio deltametrín, era solo unas 10 veces menos efectivo como inhibidor de la captación de cloro dependiente de GABA).

En resumen, la acción de los piretroides sobre los receptores GABA_A es, en cierto modo, estereoespecífica para los isómeros neurotóxicos de los compuestos α -ciano, pero no presenta la estereoespecificidad absoluta predicha para la relación estructura-toxicidad. La relativa baja potencia y la incompleta estereoespecificidad de los piretroides como antagonistas de los receptores GABA_A en ensayos funcionales no respaldan que su acción en estos receptores sea un sitio diana significativo implicado en la producción del *Síndrome CS*. Además, en ensayos en los que se han estudiado los efectos de los piretroides sobre los receptores GABA_A y los canales de sodio en la misma preparación, el bloqueo de los receptores GABA_A no se observa a concentraciones en las que el piretroide ha interrumpido la función del canal de sodio (Ogata *et al.*, 1988). Asimismo, estudios electrofisiológicos de las rutas GABAérgicas en el hipocampo de la rata demostraron que los efectos de estos insecticidas eran congruentes con un aumento de la inhibición, posiblemente como resultado de la excitación presináptica mediada por canales de sodio de las neuronas GABAérgicas,

más que por el antagonismo típico de los bloqueantes del complejo receptor GABA-ionóforo del cloro (Joy y Albertson, 1991; Joy *et al.*, 1989, 1990).

Efectos en los receptores benzodiazepina tipo periférico.

Las benzodiazepinas ejercen sus efectos terapéuticos como resultado de sus acciones sobre el complejo receptor del GABA. No obstante, se han identificado otros lugares de unión de alta afinidad en tejidos periféricos no neuronales sin receptores GABA_A (Braestrup y Squires, 1977). Diversos estudios demostraron que esta segunda clase de sitios de unión para las benzodiazepinas (llamados receptores benzodiazepina tipo periférico) pueden distinguirse de los lugares de unión asociados con los receptores GABA_A por su perfil farmacológico, distribución tisular y localización subcelular (Zisterer y Williams, 1997). La estructura y funcionalidad de este tipo de receptores todavía no se ha caracterizado por completo. Estos receptores están asociados con la membrana externa mitocondrial y parecen estar asociados con el canal aniónico voltaje-dependiente ('porina') (Zisterer y Williams, 1997). Aunque se atribuyen muchos efectos fisiológicos y bioquímicos a los ligandos de estos receptores, los más relevantes son aquéllos con efectos convulsionantes y proconvulsionantes (Ro5-4864), así como su antagonista específico (PK11195) (Benavides *et al.*, 1984).

Aunque es improbable que los efectos antagonistas sobre los receptores benzodiazepina tipo periférico sean la causa principal de la intoxicación por piretroides, pueden contribuir al efecto convulsionante originado por sus acciones en otros sitios diana (Soderlund *et al.*, 2002). Varios estudios demostraron que la mayoría de los piretroides α -ciano examinados tenían un efecto más potente que los piretroides no α -ciano

inhibiendo la unión de Ro5-4864 en preparaciones cerebrales de rata, es decir, tenían un mayor efecto proconvulsionante, si bien esta generalización no podía extenderse al fenvalerato ni al fluvalinato (Lawrence *et al.*, 1985; Devaud y Murray, 1988; Ramadan *et al.*, 1988b). Varios estudios *in vivo* con ratas también demostraron el efecto proconvulsivante de piretroides como la [1*R*,*cis*, α *S*]-cipermetrina, el deltametrín, el fenvalerato y la permetrina (Devaud y Murray, 1986, 1988), si bien otros estudios no han podido confirmar este efecto (Gilbert *et al.*, 1990).

Otros presuntos sitios diana para los piretroides que han sido identificados en experimentos *in vitro* (como los receptores acetilcolina-nicotínicos) parecen no jugar un papel destacado en la intoxicación por piretroides (Soderlund *et al.*, 2002).

3.2.DELTAMETRÍN

3.2.1. Estructura química, propiedades físico-químicas y espectro de acción

El deltametrín, (*S*)- α -ciano-3-fenoxibencil-(1*R*,3*R*)-*cis*-2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropano carboxilato (IUPAC), es un insecticida piretroide Tipo II de amplio espectro que deriva de la esterificación del análogo dibromo del ácido crisantémico (Arslan *et al.*, 2017). Su estructura química consta de tres anillos (dos anillos fenólicos unidos por un átomo de oxígeno, y un anillo ciclopropílico), de un sustituyente 2,2-dibromoetenil en el anillo ciclopropílico y de un sustituyente α -ciano en la configuración *S* del alcohol 3-fenoxibencil (Figura 6). Cuenta con tres centros quirales, que dan lugar a 8 estereoisómeros con variable actividad insecticida, siendo el deltametrín ([1*R*, *cis*, α *S*]-isómero) el de mayor eficacia (US EPA, 2010) y el único que se comercializa (Elliot *et al.*, 1974b)

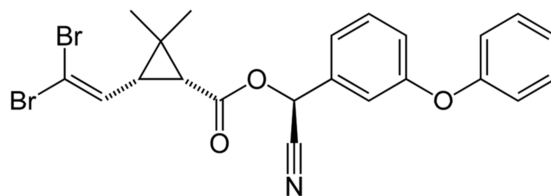


Figura 6. Estructura química del deltametrín

El deltametrín posee un elevado peso molecular. Es un compuesto lipofílico, al igual que el resto de piretroides, lo que probablemente determina su rápida acción en insectos. Con una muy baja solubilidad (solo de 0,200 ppb) y un elevado coeficiente de partición octanol/agua ($K_{ow} = 34.200$), parece que el deltametrín es potencialmente bioacumulable (US EPA, 2010). Las principales características físico-químicas del deltametrín se resumen en la Tabla 2.

Debido a su baja presión de vapor ($1,24 \times 10^{-8}$ Pa, 25°C) y a su constante de Henry (3.1×10^{-2} Pa.m³/mol, 25°C), es improbable que se volatilice de forma sustancial, lo que, unido a su alto punto de ebullición, minimiza el riesgo de contaminación atmosférica por evaporación (US EPA, 2010).

INTRODUCCIÓN

Nombre común (ISO)	Deltametrín
Nombre químico (IUPAC)	(S)- α -ciano-3-fenoxibencil-(1R, 3R)-cis-2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropano carboxilato
Nombre químico (CA)	Ácido 1R-[1 α (S),3 α)]-3-(2,2-dibromoetenil)-2,2-dimetil-ciclopropanocarboxílico, ciano(3-fenoxifenil) metil éster
Número CAS	52918-63-5
Número EEC	2582566
Pureza mínima	≥ 980 g/kg (grado técnico)
Fórmula molecular	C ₂₂ H ₁₉ Br ₂ NO ₃
Masa molecular	505.2
Punto de fusión	100 – 102°C (373-375°K), (grado técnico)
Punto de ebullición	Se descompone antes de alcanzar el punto de ebullición (grado técnico)
Apariencia	Polvo sólido blanquecino (grado técnico)
Densidad relativa	0,550 g/cm ³ (densidad aparente) (grado técnico)
Presión de vapor	1,24 x 10 ⁻⁸ Pa, 25°C
Constante de Henry	3.1 x 10 ⁻² Pa.m ³ /mol, 25°C
Solubilidad en agua	0,0002 mg/l, 25°C No dependiente del pH (determinado a pH 7,49-7,85)
Solubilidad en solventes orgánicos	Altamente soluble en la mayoría de solventes orgánicos a temperatura ambiente. 1,2-dicloroetano >600 g/l, 20°C Acetona 300-600 g/l, 20°C Dimetilsulfóxido 200-300 g/l, 20°C Etil acetato 200-300 g/l, 20°C p-xileno 150-200 g/l, 20°C Xileno 175 g/l, 20°C Acetonitrilo 60-75 g/l, 20°C Metanol 8,15 g/l, 20°C n-heptano 2,47 g/l, 20°C
Coefficiente de partición (log P _{ow})	4,6 (25°C, pH 7,6); no dependiente del pH
Hidrólisis (DT ₅₀)	pH 5, 7: estable (25°C) pH 8: 31 días (23°C) pH 9: 2,5 días (valor medio) (25°C)
Constante de disociación	No disocia
Inflamabilidad	No inflamable
Propiedades explosivas	No explosivo
Absorción UV/VIS (máx.)	Absorción máxima a 267, 271 y 278 nm Absorción baja-muy baja a 290-300 nm
Fotoestabilidad en agua (DT ₅₀)	Fototransformación directa t _{1/2} = 48 días Fototransformación indirecta t _{1/2} = 4 días

Tabla 2. Identidad y propiedades fisicoquímicas del deltametrín (European Commission, 2002)

Los metabolitos del deltametrín observados en laboratorio son el resultado de la ruptura del enlace éster de la molécula padre; se cree que son menos tóxicos que aquél, porque presumiblemente han perdido la acción neurotóxica característica del padre (el órgano diana del deltametrín es el sistema nervioso) (US EPA 2010). En la Tabla 3 se muestran los principales productos de degradación del deltametrín.

INTRODUCCIÓN

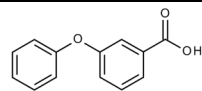
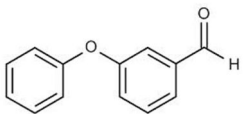
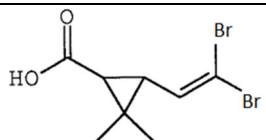
Nombre común	Nombre Químico	Estructura
Alpha-R-deltametrín	(R)- α -ciano-3-fenoxibencil-(1R, 3R)-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropano carboxilato	Ácido (R) alcohol (1R)-cis del deltametrín (estructura no disponible)
m-PBA, mPBAc o 3-PBA (CAS 3739-38-6)	Ácido 3-fenoxibenzoico	
3-PBALdehído (CAS 39515-51-0)	3-fenoxibenzaldehído	
Ácido decametrínico o cis-Br ₂ CA (CAS 53179-78-5)	ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropanocarboxílico	

Tabla 3. Productos mayoritarios de la transformación del deltametrín (US EPA, 2010)

En agricultura, el deltametrín parece unirse fuertemente al suelo y la materia orgánica, si bien esta unión no es instantánea o inmediata. No se espera que filtre bajo la superficie. Puede alcanzar el medio ambiente acuático por deriva de aplicación (dispersión de plaguicidas en el aire) o por escorrentía, acompañados de erosión. Parece ser de moderado a altamente persistente en entornos terrestres (metabolismo aeróbico del suelo con una semivida de 20-55 días; dispersión en el medio terrestre entre 14-231 días) (US EPA, 2010). La degradación aeróbica se produce por hidrólisis sobre el enlace tipo éster, seguida de oxidación y mineralización hasta formar $^{14}\text{CO}_2$. La semivida de degradación del deltametrín bajo condiciones anaeróbicas se ha estimado en 32-36 días, y se produce por epimerización seguida de ruptura del enlace éster, oxidación y mineralización, formando $^{14}\text{CO}_2$ que se incorporará a la biomasa del suelo (WHO/FAO, 2002). Las constantes de adsorción del deltametrín se determinaron en cuatro suelos estándar de Estados Unidos que iban desde franco arenosos a franco arcilloso-limosos. Las características de adsorción y desorción del deltametrín no variaron mucho entre los suelos, y teniendo en cuenta los valores del coeficiente de adsorción al carbono orgánico

calculados ($\log K_{oc}$), el compuesto puede considerarse inmóvil. En estudios sobre cultivos de rotación confinados, no se encontraron residuos significativos de deltametrín ($<0,01$ mg/kg) en ningún material de cultivo. Se concluye que es poco probable que cultivos sucesivos o rotativos contengan residuos significativos de deltametrín (WHO/FAO, 2002).

En el medio ambiente acuático, el deltametrín es estable a la degradación por hidrólisis a pH bajo (5 y 7), pero se degrada rápidamente a pH 9 (semivida de 2,5 días), identificándose dos productos de degradación: 3-fenoxibenzaldehído (*mPB* aldehído) y trazas de ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil)-ciclopropanocarboxílico (Br_2CA o ácido decametrínico). Por tanto, es improbable que la hidrólisis abiótica contribuya significativamente a la degradación del deltametrín en sistemas acuáticos, a menos que el pH sea elevado (WHO/FAO, 2002). Puede producirse fotodegradación indirecta del deltametrín, pero se considera una ruta menor de degradación (hidrólisis esteérica e isomerización cis-trans, siendo los principales productos de degradación el ácido 3-fenoxibenzoico [*mPB* ácido] y el ácido decametrínico [Br_2CA]). La biodegradación en el medio ambiente acuático es muy lenta (no fácilmente biodegradable en estudios de lodos residuales activados, pues se mantiene el 74-84% de la concentración inicial después de 28 días) (WHO/FAO, 2002). El deltametrín tiene el potencial de ser persistente en el medio acuático, donde puede repartirse en el sedimento y puede afectar a organismos bentónicos y epibentónicos (European Commission, 2002). El deltametrín se distribuye principalmente en la materia orgánica en suspensión, la biota y eventualmente el sedimento (WHO/FAO, 2002).

El deltametrín es un insecticida no sistémico perteneciente a la familia de los piretroides Tipo II que impide la transmisión de los impulsos nerviosos en organismos nocivos, afectando a su sistema nervioso. Empleado para controlar muchas especies de insectos, en particular *Lepidoptera*, *Coleoptera* y *Homoptera*, en un amplio abanico de cultivos, el deltametrín es una sustancia activa de la primera fase del programa de trabajo para la revisión y autorización de sustancias activas existentes de la Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. Autorizado en 2003 para un uso exclusivamente insecticida, fue revisado en 2002 e incluido en el Anexo I de la Directiva 91/414/CEE, mediante la Directiva 2003/5/CE de la Comisión, de 10 de enero de 2003, por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo a fin de incluir la sustancia activa deltametrín. Actualmente, el Reglamento de Ejecución (UE) N° 2016/950 de la Comisión, de 15 de junio de 2016, prorroga el período de aprobación del deltametrín como sustancia activa fitosanitaria hasta el 31 de octubre de 2017, a la espera de que se termine su evaluación de riesgos. Los límites máximos de residuos (LMRs) para el deltametrín quedan establecidos en los Anexos II y IIIB del Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo, y en sus posteriores enmiendas (Reglamento (UE) N° 149/2008, Reglamento (UE) N° 839/2008, Reglamento (UE) N° 524/2011, Reglamento (UE) N° 441/2012 y Reglamento (UE) N° 2016/1822).

Asimismo, el deltametrín ha sido evaluado con arreglo al Reglamento (CE) N° 1451/2007, de conformidad con lo dispuesto en la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas, para su uso en el tipo

de producto 18, insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos. El deltametrín se autorizó finalmente mediante la Directiva 2011/81/UE de la Comisión de 20 de septiembre de 2011, por la que se modifica la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de forma que incluya el deltametrín como sustancia activa en su Anexo I. La fecha para de vencimiento de la inclusión es el 30 de septiembre de 2023.

A la luz de los riesgos detectados para el ecosistema acuático en ambas evaluaciones, los Estados Miembros atenderán especialmente a la protección de los organismos acuáticos, abejas y artrópodos no diana, y velarán porque las condiciones de autorización de esos productos incluyan, cuando corresponda, medidas de reducción del riesgo. Asimismo, atenderán especialmente a la seguridad de los operarios y velarán por que las condiciones de autorización incluyan medidas adecuadas de protección.

Otros usos autorizados del deltametrín incluyen el control de parasitosis externas producidas por moscas, garrapatas y piojos en ganado bovino y ovino mediante su uso tópico, así como la prevención de infestaciones por garrapatas y pulgas, y un efecto repelente (antialimentación) para los mosquitos *Phlebotomus spp.* y los mosquitos culícidos del complejo *Culex pipiens* en perros, por lo que puede utilizarse como parte de un programa de prevención frente a la leishmaniosis (Wylie *et al.*, 2014).

De acuerdo con los criterios establecidos en el Reglamento (CE) N° 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (Reglamento CLP), el deltametrín tiene la siguiente clasificación armonizada de peligros:

- Toxicidad aguda, por inhalación - Categoría 3 (indicación de peligro H331).
- Toxicidad aguda, oral - Categoría 3 (indicación de peligro H301).

- Peligroso para el medio ambiente acuático – Peligro acuático agudo - Categoría 1 (indicación de peligro H400).
- Peligroso para el medio ambiente acuático - Peligro acuático crónico - Categoría 1 (indicación de peligro H410).

3.2.2. Mecanismo de acción

Los canales de sodio voltaje-dependientes de las células nerviosas constituyen el principal sitio de acción de los piretroides en insectos y vertebrados (Soderlund y Knipple, 1999; Anadón *et al.*, 2006). Todos los piretroides afectan tanto al sistema nervioso central como periférico, pues se unen a los canales de sodio voltaje-dependientes prolongando su permeabilidad al ión Na^+ durante la fase excitatoria del potencial de acción. Esto da lugar a despolarizaciones espontáneas de la membrana nerviosa, aumento de la secreción de neurotransmisores, bloqueo de la conducción del impulso nervioso y bloqueo neuromuscular que deviene en parálisis del insecto (US EPA, 2010).

Los piretroides Tipo II como el deltametrín, que tienen un grupo α -ciano en su fracción alcohólica, causan una prolongación de larga duración del incremento transitorio en la permeabilidad de la membrana al sodio durante la excitación. Mantienen la modificación de los canales del sodio de forma persistente, despolarizan la membrana y causan un bloqueo uso-dependiente del potencial de acción: producen corrientes de cola muy persistentes, retrasando la inactivación del canal por un período de tiempo mucho mayor que los piretroides Tipo I y aumentando el tiempo medio de apertura del canal (Bloomquist, 1993; Narahashi, 1996; O'Reilly *et al.*, 2006).

Otros posibles sitios de acción del deltametrín se detallan a continuación:

- El bloqueo de los canales de cloro voltaje-dependientes producido por algunos piretroides como el deltametrín (Forshaw *et al.*, 1987,1990, 1993), contribuye a la producción de salivación, un signo característico del *Síndrome toxicológico CS* (Soderlund, *et al.*, 2002), pero no parece probable que sea la causa primaria de este signo para todos los compuestos (Burr y Ray, 2004), por lo que las diferencias de acción de los piretroides Tipo I y II sobre los canales de cloro no pueden ser las responsables de las diferencias entre los dos síndromes toxicológicos.
- Existen evidencias experimentales que demuestran que al menos algunos piretroides actúan sobre algunas isoformas de los canales de calcio voltaje-dependientes modificando su funcionalidad, lo que puede contribuir a la liberación de neurotransmisores asociada a la intoxicación por piretroides (Symington *et al.*, 2007a, 2008, 2011), si bien no existe una base que permita identificar estos efectos sobre los canales de calcio como esenciales en el mecanismo de intoxicación por piretroides (Soderlund, 2012). Estudios con deltametrín parecen indicar que incrementa considerablemente la liberación de neurotransmisores calcio-dependientes (Brooks y Clark, 1987; Eells y Dubocovich, 1988; Symington *et al.*, 2007a, 2008, 2011) y que puede influir en la funcionalidad del canal de calcio a la alza o a la baja (Symington *et al.*, 2007b, Alves *et al.*, 2010).
- Varios estudios *in vitro* (Lawrence *et al.*, 1985; Devaud y Murray, 1988; Ramadan *et al.*, 1988b) e *in vivo* (Devaud y Murray, 1986, 1988), demostraron el potente efecto proconvulsinante del deltametrín y otros piretroides α -ciano

por sus efectos antagonistas sobre los receptores benzodiazepina tipo periférico, si bien otros estudios no han podido confirmar este efecto (Gilbert *et al.*, 1990).

- En 1980, un estudio demostró la inhibición estereoespecífica sobre el complejo receptor GABA-ionóforo del cloro producida por el deltametrín (pero no por su α -R epímero no tóxico), originando el efecto proconvulsionante característico del *Síndrome CS* (Leeb-Lundberg y Olsen, 1980). Estudios posteriores con éste y otros piretroides confirmaron la acción estereoespecífica de los isómeros neurotóxicos de los piretroides α -ciano como antagonistas de los receptores GABA_A, si bien la estereoespecificidad no era absoluta, es decir, la inhibición de la captación del cloro era incompleta a las concentraciones efectivas de los piretroides (Bloomquist y Soderlund, 1985; Abalis *et al.*, 1986, Bloomquist *et al.*, 1986; Ramadan *et al.*, 1988a). En definitiva, su acción en estos receptores no respalda que éstos sean un lugar diana primario implicado en la producción del *Síndrome CS*.

3.2.3. Metabolismo y toxicocinética

La biotransformación inicial de la mayoría de los piretroides resulta del ataque tanto de esterasas sobre el enlace central tipo éster, como de monooxigenasas del citocromo P-450 en uno o más sitios de las fracciones ácidas o alcohólicas (Soderlund *et al.*, 2002). Estudios del metabolismo del deltametrín administrado por vía oral en ratas (WHO, 1990; Ruzo *et al.*, 1978), revelaron que los principales mecanismos implicados son:

- Ruptura del enlace éster.
- Oxidación (sobre todo en la posición 4', pero también en las posiciones 5 y 2' de la fracción alcohólica, y en el grupo *trans*-metilo de la fracción ácida).

- Conversión del grupo ciano a tiocianato y ácido iminotiazolidina-4-carboxílico (ITCA).

Los metabolitos éster hidroxilados, y los metabolitos ácido carboxílico y los derivados fenólicos originados con la ruptura del enlace éster se conjugan con ácido sulfúrico, glicina, y/o ácido glucurónico para ser excretados. Tras su administración oral en ratas macho, tanto el deltametrín como varios de sus metabolitos son eliminados casi por completo en 2-4 días (Ruzo *et al.*, 1978). El deltametrín sin transformar es el compuesto mayoritario encontrado en heces (EFSA, 2009; WHO, 1990) suponiendo un 13-21% de la dosis administrada, y seguido del 4'-OH-deltametrín, 5-OH-deltametrín y de trazas del 2'-OH-deltametrín (WHO, 1990). Los principales metabolitos de la fracción ácida del deltametrín son rápidamente excretados como ácido decametrínico (Br₂CA) en su forma libre (10% de la dosis administrada), como glucurónido (51%), y como conjugados con glicina (trazas) (WHO, 1990); el derivado hidroximetil (OH-Br₂CA) también se excreta en forma libre o como glucurónido (<1%) (WHO, 1990). En lo que respecta a los principales metabolitos de la porción aromática de la fracción alcohólica son el ácido 3-fenoxibenzoico en su forma libre (5%), como glucuroconjugado (13%) y como conjugados con glicina (4%). En orina se han encontrado diferentes compuestos (EFSA, 2009), siendo el metabolito principal el tiocinato (38%) (Ruzo *et al.*, 1978). Las concentraciones de residuos más altas encontradas en tejidos se hallaron en piel y estómago, en este último caso debido a la retención temporal del tiocianato. En general, las cantidades de residuos retenidos en tejidos tras 7 días de la administración del deltametrín fueron bajas, representando solo un 0,59-1,9% de la dosis total administrada (EFSA, 2009).

Las principales rutas metabólicas del deltametrín en ratones son muy similares a las de las ratas. Las principales diferencias entre estas especies son una mayor presencia de deltametrín sin transformar en las heces de los ratones que en las de las ratas, que los ratones producen menores cantidades de compuestos fenólicos y que las reacciones de conjugación de la fracción alcohólica se producen con glicina en el caso de la rata, y con taurina en el caso del ratón (WHO, 1990).

La absorción y excreción del deltametrín también se ha estudiado en vacas en lactación. Parece que el deltametrín se absorbe en pequeñas cantidades en el tracto gastrointestinal, a la vista de las bajas concentraciones detectadas en sangre. El compuesto absorbido fue ampliamente metabolizado y eliminado, con muy escasa acumulación tisular. El 36-43% del total administrado se elimina en las heces dentro de las 24 horas post-administración, la mayor parte en forma de deltametrín sin transformar (78-82%). Solo un 4-6% de la dosis administrada se eliminó a través de la orina, y un 0,42-1,6% se excretó en la leche, siendo el deltametrín el principal residuo encontrado (EFSA, 2009).

La toxicocinética del deltametrín y de otros piretroides sintéticos es relativamente poco conocida en humanos y otros mamíferos, pese a la frecuente exposición de la población a esta clase de insecticidas. En la rata, las curvas de concentración-tiempo del deltametrín se ajustan a un modelo bicompartimental abierto tras su administración por vía oral (v.o.) e intravenosa (i.v.), con una semivida de distribución ($t_{1/2\alpha}$) de 1,39 horas tras administración i.v., seguida por una semivida de eliminación prolongada ($t_{1/2\beta}$) de 33 horas, y por tanto puede ejercer efectos sistémicos (Anadón *et al.*, 1996). Sus elevados volúmenes de distribución aparente ($V_{d(\text{área})}$) y de distribución en estado estacionario

($V_{d(ss)}$) tras su administración intravenosa indican una amplia difusión en los tejidos (5,33 y 2,04 l/kg, respectivamente) (Anadón *et al.*, 1996).

Al administrarse por vía oral en ratas, la absorción gastrointestinal del deltametrín puede considerarse rápida, siendo el tiempo cuando se alcanza la concentración máxima en sangre ($C_{m\acute{a}x}$) de 1-2 horas (Anadón *et al.*, 1996; Kim, *et al.*, 2008) con una biodisponibilidad en un rango de 14-18% (Anadón *et al.*, 1996; Kim, *et al.*, 2008). El deltametrín presenta tras administración oral una semivida de eliminación lenta ($t_{1/2\beta}$ = 38,50 horas), valor algo más prolongado que el que se observa tras administración i.v. (Anadón *et al.*, 1996). Esta diferencia podría resultar por un proceso de circulación enterohepática.

A pesar de su relativa baja biodisponibilidad tras administrarse por vía oral, el deltametrín alcanza altas concentraciones en SNC y SNP (en las fibras neuromusculares conducto deferente y anocoxígeo en ratas) (Anadón *et al.*, 1996). El deltametrín atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica y entra en el SNC, siendo el hipotálamo y el hipocampo las regiones cerebrales diana primarias, con valores de la ratio de las área bajo la curva tejido/plasma elevados ($AUC_{tejido}/AUC_{plasma}$ de 295,30 y 92,99 mg.h/L, respectivamente). Por orden decreciente, las concentraciones más altas se encontraron en hipotálamo, hipocampo, anocoxígeo, cerebelo, conducto deferente, corteza frontal, cuerpo estriado y bulbo raquídeo (Anadón *et al.*, 1996).

El deltametrín se metaboliza rápidamente a 4'-OH-deltametrín, metabolito que exhibe una cinética plasmática y tisular equivalente a la del compuesto padre: aparece rápidamente en plasma tras la administración oral e intravenosa del deltametrín,

ajustándose a un modelo bicompartimental abierto con una lenta eliminación ($t_{1/2\beta}$ = 30,13 y 25,67 horas tras administración oral e intravenosa, respectivamente). Al igual que el deltametrín, este metabolito se elimina lentamente (semivida de eliminación mayor de 20 horas) (Anadón *et al.*, 1996).

En un ensayo de toxicidad *in vitro* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, el deltametrín y sus metabolitos 2'-OH-deltametrín y 4'-OH-deltametrín inducen citotoxicidad de forma dosis-dependiente, siendo ambos metabolitos más tóxicos que el compuesto padre. El deltametrín y sus metabolitos aumentan los niveles de óxido nítrico e inducen peroxidación lipídica, resultados que apuntan al deltametrín con un efecto de estrés oxidativo (Romero *et al.*, 2012).

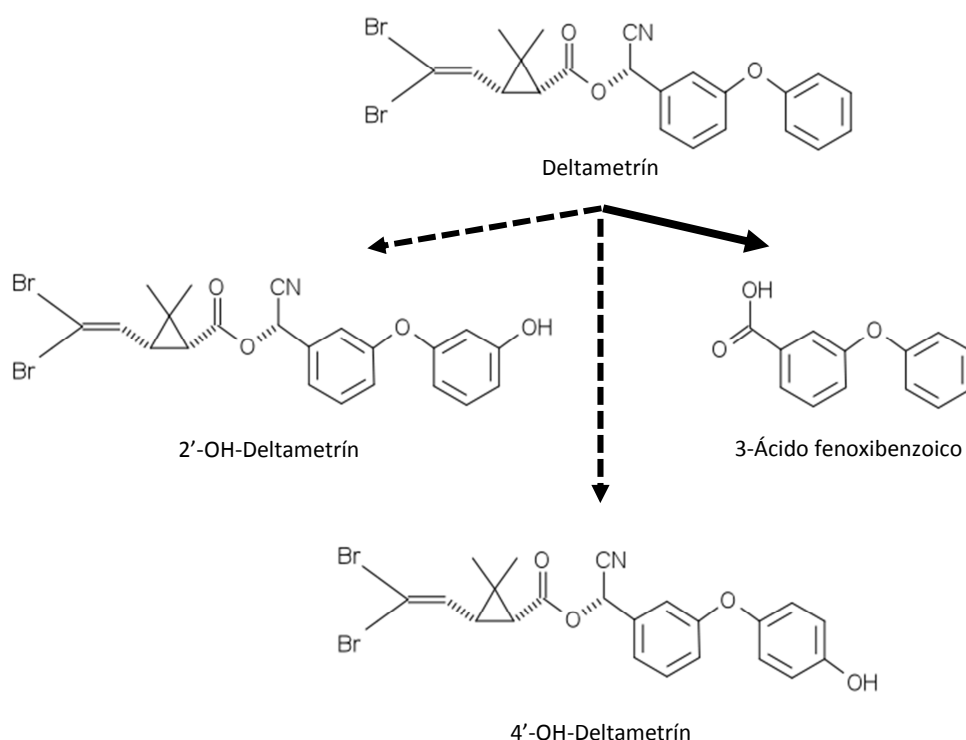


Figura 7. Estructura química del deltametrín y sus metabolitos principales: 3-ácido fenoxibenzoico, 2'-OH-deltametrín y 4'-OH-deltametrín. El citocromo P-450 metaboliza el deltametrín mediante oxidación (flechas de puntos) e hidrólisis mediada por esterasas (flecha sólida).

3.2.4. Toxicidad en mamíferos

El deltametrín se considera uno de los más potentes insecticidas piretroides (Ruzo y Casida, 1977; Pham *et al.*, 1984). Aunque inicialmente se pensaba que tenía una baja toxicidad en mamíferos, varios estudios pusieron de manifiesto diversos efectos y hoy en día es considerado como un compuesto neurotóxico (Vais *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2001; Bradberry *et al.*, 2005).

La publicación del descubrimiento del deltametrín (Elliot *et al.*, 1974a), el primer piretroide con la fracción α -ciano-3-fenoxibencil, se acompañó de una breve descripción de la toxicidad aguda del deltametrín en ratas (Barnes y Verschoyle, 1974). Esta descripción destacaba los signos de intoxicación del deltametrín tras su administración oral o intravenosa, que incluían salivación sin lagrimeo, seguido de sacudidas en las patas (tremor) que progresaban hacia contorsiones sinuosas (coreoatetosis). Los signos de intoxicación observados con el deltametrín fueron la base para la descripción original del *Síndrome CS*.

Ray y Cremer (1979) realizaron un estudio detallado en el tiempo de los signos de intoxicación por deltametrín en la rata, al ser administrado por diferentes vías. Inicialmente observaron masticación, acción de derrota y salivación. Seguidamente, aparecieron una serie de signos motores como un comportamiento de escarbar, tremor corporal pronunciado asociado al movimiento, desarrollo gradual del tono extensor de las patas y elevación de la respuesta de alarma. A continuación, comenzó la coreoatetosis, con movimientos lentos de torsión y contorsión del cuello y de la cola, que aumentaban en fuerza y velocidad ante estímulos sensoriales. A medida que la

intoxicación progresaba, la coreatetosis se hacía continua, perdiéndose la respuesta de equilibrio gradualmente. En general, los casos de muerte se asociaron con ataques tónicos, mientras que los animales que no padecieron estos ataques se recuperaron entre las 2-8 horas siguientes al inicio de la atetosis, apareciendo completamente normales a las dos semanas del tratamiento. Con el inicio de la salivación se observó una disminución de la presión arterial y de la temperatura rectal, y un aumento de la glucosa en sangre. Después, con el desarrollo de la coreoatetosis y de las convulsiones, se produjo un aumento de la presión arterial y una marcada acidosis asociada al aumento del lactato en sangre, consecuencia probable del aumento de la actividad muscular. El ritmo cardíaco disminuyó en el inicio de los espasmos, acompañado de una miosis transitoria.

Los signos motores originados por el deltametrín sugieren una toxicidad sobre el sistema nervioso central, y los síntomas de masticación, comportamiento de derrota, rigidez y los movimientos de coreoatetosis sugieren una acción mediada por los ganglios basales. La rápida metabolización y eliminación del deltametrín en el organismo podría explicar la reversibilidad aparente de los síntomas agudos.

Toxicidad aguda

Los estudios de toxicidad aguda del deltametrín disponibles en rata demuestran que la toxicidad tras su administración oral es dependiente del vehículo utilizado. La Tabla 4 describe la DL50 oral del deltametrín dependiendo del vehículo utilizado.

Vehículo	Sexo	DL50 (mg/kg p.c.)	Signos clínicos
Aceite de maíz	Macho	95	Alteraciones en la marcha, convulsiones repetidas, salivación.
	Hembra	87	
PEG 200	Macho	67	Incoordinación motora, convulsiones, alteraciones respiratorias, hipomotilidad.
	Hembra	86	
Aceite de sésamo	Macho	128	Incoordinación motora, convulsiones, alteraciones respiratorias, hipomotilidad.
	Hembra	139	
Aceite de cacahuete	Macho	52	Convulsiones, salivación de moderada a severa.
	Hembra	31	
Solución acuosa de metilcelulosa (1% p/v)	Macho Hembra	-	Todos los animales sobrevivieron a dosis superiores a 5000 mg/kg, sin efectos tóxicos visibles.

Tabla 4. Toxicidad aguda del deltametrín tras su administración por vía oral en rata (EFSA, 2009).

Toxicidad subcrónica y crónica

Se han llevado a cabo estudios de toxicidad a corto plazo del deltametrín por vía oral en ratones, ratas y perros. Los signos clínicos observados fueron salivación, tremor, hipersensibilidad, daño en la actividad locomotora, y reducción del peso corporal, así como de la ganancia de peso y del consumo de alimento. La severidad de los efectos tóxicos dependió del vehículo empleado. Los efectos más severos se observaron al administrar deltametrín mediante sondaje oral en una solución de polietilenglicol. En estudios dietéticos de 13 semanas de duración, se observó mortalidad a dosis de 3000 ppm en ratas (equivalentes a 425 y 444 mg/kg p.c./día en machos y hembras, respectivamente) y ratones (equivalente a 603 y 739 mg/kg p.c./día en machos y hembras, respectivamente). La rata parece ser la especie más sensible, como se evidencia por la severidad de los signos neurológicos observados a altas dosis. No se detectaron engrosamientos ni cambios microscópicos en el sistema nervioso. El nivel

sin efecto adverso observable (NOAEL) para estos tiempos de exposición (12-13 semanas) es muy similar en ratas y perros: 1mg/kg p.c. (EFSA, 2009).

En el perro, la administración por vía oral de deltametrín a dosis de 0, 2, 10 y 50 mg/kg p.c. durante 90 días, seguida de un período de recuperación de 4 semanas, dio lugar a la aparición de signos clínicos neurológicos y de toxicidad sistémica (disminución de la ingesta de alimento, pérdida de peso, aparición de vómitos y salivación) en los animales tratados con la dosis de 50 mg/kg p.c. Se determinó un NOAEL de 10 mg/kg p.c. (EMEA, 2004).

Se ha realizado un estudio en perros Beagle, a los que se trató oralmente durante un año con dosis de 1, 10 y 50 mg/kg p.c./día de deltametrín, mediante cápsulas de gelatina. Inestabilidad en la marcha, extensión de los miembros y los dígitos, tremor y rascado y mordisqueo de las extremidades fueron los signos clínicos observados en los grupos tratados con dosis de 10 y 50 mg/kg p.c./día. No se detectaron engrosamientos ni cambios microscópicos en el sistema nervioso, pero sí cambios en el comportamiento y heces líquidas. El NOAEL fue de 1 mg/kg p.c. (EFSA, 2009).

También se han descrito otros estudios de toxicidad crónica del deltametrín (EFSA, 2009) que se presentan en la Tabla 5:

Especie	Tipo de estudio	Sexo	NOAEL (mg/kg)	Signos clínicos
Ratón	Estudio dietético (2 años): Dosis de 0, 0.12, 0.6, 3 y 12 mg/kg p.c. en machos y 0, 0.15, 0.75, 3.8, 15 mg/kg p.c. en hembras	Macho Hembra	12 15	No se observaron (NOAEL se corresponde con la máxima dosis testada).
Ratón	Estudio dietético (97 semanas): Dosis de 0, 2, 16, 155 y 315 mg/kg p.c. en machos y 0, 2, 20, 189 mg/kg p.c. en hembras	Macho Hembra	16 189	Emaciación, disnea, úlceras cutáneas.
Rata	Estudio dietético (2 años): Dosis de 2, 20, y 50 ppm	Macho Hembra	0,8 1,1	Pérdida de peso y variación del peso medio de varios órganos.
Rata	Estudio dietético (2 años): Dosis de 25, 125, 500 y 800 ppm	Macho Hembra	1 30	Incoordinación motora a la dosis más alta en ambos sexos, y a 500 ppm en machos. Pérdida de peso y reducción del consumo de alimento. Cambios en parámetros hematológicos. Sin evidencias histopatológicas de lesiones neuronales. Hepatotoxicidad.

Tabla 5. Toxicidad crónica del deltametrín tras su administración por vía oral (EFSA, 2009).

No se han descrito efectos carcinogénicos ni mutágenicos del deltametrín en ratas y ratones (WHO, 1990; EFSA, 2009). Tampoco el deltametrín en ensayos de toxicidad sobre la reproducción y desarrollo origina efectos embriológicos ni teratogénicos en ratones, ratas ni conejos (EFSA, 2009).

Toxicidad en el hombre

A pesar de que los piretroides se vienen utilizando desde hace más de 30 años a escala mundial, hay poca documentación disponible relativa a casos de intoxicación aguda en humanos. La principal fuente de información con que contamos es una completa revisión de 573 casos de envenenamiento agudo por piretroides reportado en la literatura médica china durante el período de 1983-1988, de los cuales, solo 7 casos

terminaron con la muerte del afectado (He *et al.*, 1989). En 325 casos estuvo implicado el deltametrín, tanto por una exposición profesional resultado de un mal manejo durante su aplicación en la agricultura, como por exposición accidental, generalmente por ingestión de productos insecticidas. Los signos comunes de intoxicación por piretroides incluían mareos, dolor de cabeza, náuseas, anorexia y fatiga, y los casos más serios exhibían severas fasciculaciones musculares, pérdida de consciencia, coma y ataques convulsivantes. Todos los pacientes recibieron tratamiento sintomático y terapia de soporte, y la mayoría se recuperó dentro de los 6 días siguientes a la exposición, aunque los pacientes que experimentaron convulsiones necesitaron hasta 55 días para recuperarse.

Aunque los efectos letales de los piretroides son infrecuentes, los datos recogidos en los centros de control de venenos muestran una incidencia significativa de la exposición a piretroides. Durante el período de 2001-2004, el Sistema de Vigilancia de Exposición a Tóxicos, de la Asociación Americana de Centros de Control de Venenos, recibió 55.610 informes de exposición a piretroides, de los cuales casi un tercio fueron en niños menores de cinco años de edad. Solo una pequeña proporción de estos casos (2.433, el 4,4%) se caracterizó por producir efectos moderados/graves, y solo tres fueron letales (Soderlund, 2010).

Las experiencias de los trabajadores implicados en el manejo de formulados técnicos de piretroides, durante su fabricación y su utilización, nos proporciona información de utilidad acerca de los efectos de los piretroides en humanos por exposición cutánea. Dos revisiones (Clark, 1995; Vijverberg y van den Bercken, 1990) resumen los datos de exposición ocupacional procedentes de informes clínicos publicados y de informes no

publicados de la industria. El síntoma más frecuentemente declarado fue la parestesia, caracterizada por entumecimiento, prurito, quemazón, u hormigueo de la piel, generalmente limitados a la zona de la piel directamente expuesta, y en ausencia de eritema, edema, vesiculación u otros signos de irritación cutánea. La parestesia inducida por piretroides fue transitoria y reversible unas horas después de la exposición, pero en algunos casos llegó a durar hasta 48 horas. No se observaron signos de toxicidad aguda en ninguno de los casos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios realizados en animales de experimentación (Cagen *et al.*, 1984) y en voluntarios humanos (Flannigan y Tucker, 1985). Basándonos en estas observaciones, la parestesia inducida por piretroides se postula como un efecto excitatorio directo de dichos insecticidas sobre pequeñas fibras nerviosas sensoriales cutáneas, más que una respuesta a la irritación clásica de la piel (Soderlund *et al.*, 2002).

La evaluación de riesgos del deltametrín se basa en los signos neurológicos observados en animales adultos de diferentes especies. Tanto la EFSA como la US EPA, en base a estudios de toxicidad crónica identifican como punto crítico el descenso de la actividad motora, con un NOAEL de 1 mg/kg p.c. obtenido en dos estudios en perros tratados con deltametrín por vía oral, de 90 días y un año de duración, respectivamente (EFSA, 2009; US EPA, 2010). Se considera que este valor pudiera ser aplicable a todos los escenarios de exposición independientemente de su duración. Tomando este NOAEL, y aplicando un factor de seguridad (FS) de 100 se obtienen los siguientes valores:

- ADI (Ingesta Diaria Admisible) = $\text{NOAEL} / \text{FS} = 0,01 \text{ mg/kg p.c.}$
- ARfD (Dosis aguda de Referencia) = $\text{NOAEL} / \text{FS} = 0,01 \text{ mg/kg p.c.}$
- AOEL (Nivel de Exposición Admisible para el Operario) = $(\text{NOAEL} / \text{FS}) \times 0,75$
(ajuste por la absorción gastrointestinal) = $0,0075 \text{ mg/kg p.c.}$

3.2.5. Ecotoxicología

Debido a los usos del deltametrín, diversas especies pueden estar expuestas tanto acuáticas como terrestres: aves, reptiles, mamíferos, anfibios, peces de agua dulce y marina, invertebrados terrestres y acuáticos, y plantas acuáticas y terrestres. Se espera exposición por deriva y escurrimiento tras la aplicación aérea o terrestre del deltametrín (US EPA, 2010). A continuación, se resumen los efectos ecotoxicológicos del deltametrín sobre distintos grupos taxonómicos (Tabla 6 y Tabla 7).

Especies terrestres

Especie	Taxón representado	Criterio de valoración (Endpoint)	Concentración media
<i>Colinus virginianus</i>	Aves, fase terrestre de anfibios y reptiles	DL ₅₀	> 2250 mg/kg
<i>Anas platyrhynchos</i>		DL ₅₀	> 4640 mg/kg
<i>Colinus virginianus</i> y <i>Anas platyrhynchos</i>		NOAEC	450 mg/kg
<i>Apis mellifera</i>	Invertebrados terrestres	DL ₅₀	0,0015 µg/abeja

Tabla 6. Resumen de los datos de toxicidad más sensibles del deltametrín en estudios ecotoxicológicos en organismos terrestres (US EPA, 2010).

Los datos de toxicidad oral aguda disponibles sugieren que el deltametrín es prácticamente no tóxico en las aves. La DL₅₀ tras una única administración en la codorniz cotuí nortea (*Colinus virginianus*) es mayor de 2250 mg/kg. La DL₅₀ tras su administración diaria a través de la dieta durante 8 días en el ánade real (*Anas platyrhynchos*) es mayor de 4640 mg/kg. El deltametrín no mostró efectos adversos para la reproducción a la máxima concentración testada (NOAEC = 450 mg/kg) en dos

estudios crónicos de una generación realizados sobre la codorniz cotuí y el ánade real (US EPA, 2010).

El deltametrín es muy tóxico para los invertebrados terrestres. Un estudio de toxicidad aguda por contacto sobre abejas (*Apis mellifera*), produjo una DL_{50} de 0,0015 $\mu\text{g}/\text{abeja}$ (US EPA, 2010), mientras que la toxicidad aguda oral es de $DL_{50} = 0,0079 \mu\text{g}/\text{abeja}$ (European Commission, 2002). El NOAEL es de 6,25 g de sustancia activa por hectárea (European Commission, 2002).

Especies acuáticas

En lo referente al agua dulce, el deltametrín es muy tóxico para los peces, con una concentración letal 50 (CL_{50}) de 0,58 $\mu\text{g}/\text{l}$ en ensayos agudos de 96 horas sobre *Lepomis gibbosus* (perca sol). Un estudio crónico de 28 días en ciprínidos (*Pimephales promelas*) dio como resultado una concentración sin efecto adverso observable (NOAEC) de 0,017 $\mu\text{g}/\text{l}$ y una concentración más baja capaz de producir efectos adversos (LOAEC) de 0,035 $\mu\text{g}/\text{l}$, basadas en la reducción del crecimiento de hembras (US EPA, 2010). *Daphnia magna* es la especie de elección para el estudio de los invertebrados acuáticos en agua dulce. Estudios en esta especie sugieren que el deltametrín también es extremadamente tóxico para estos invertebrados, con valores de toxicidad aguda que oscilan entre 0,57 y 3,5 $\mu\text{g}/\text{l}$ (CL_{50} a las 48 h), y con una toxicidad crónica en estudios de 21 días con valores de NOAEC = 0,0041 $\mu\text{g}/\text{l}$ y LOAEC = 0,0089 $\mu\text{g}/\text{l}$, basados en efectos sobre el crecimiento y la reproducción (US EPA, 2010).

Con respecto a la toxicidad en especies marinas y de estuario, el deltametrín es muy tóxico para los peces, con una CL_{50} de 0,58 $\mu\text{g/l}$ en ensayos de toxicidad aguda de 96 horas en *Cyprinodon variegatus*, así como para los invertebrados (*Mysidopsis bahía*), con una CL_{50} de 0,0037 $\mu\text{g/l}$ en ensayos de toxicidad aguda de 96 horas (US EPA, 2010).

Especie	Taxón representado	Criterio de valoración (Endpoint)	Concentración
<i>Lepomis gibbosus</i>	Peces de agua dulce y fase acuática de anfibios	CL ₅₀ (96 horas)	0,58 µg/l
<i>Pimephales promelas</i>		NOAEC (28 días)	0,017 µg/l
		LOAEC (28 días)	0,035 µg/l
<i>Daphnia magna</i>	Invertebrados de agua dulce	CL ₅₀ (48 horas)	0,57 - 3,5 µg/l
		NOAEC (21 días)	0,0041 µg/l
		LOAEC (21 días)	0,0089 µg/l
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Peces marinos y de estuario	CL ₅₀ (96 horas)	0,58 µg/l
<i>Mysidopsis bahia</i>	Invertebrados marinos y de estuario	CL ₅₀ (96 horas)	0,0037 µg/l

Tabla 7. Resumen de los datos de toxicidad más sensibles del deltametrín en estudios ecotoxicológicos en organismos acuáticos (US EPA, 2010).

3.3.NEUROTOXICIDAD

El aumento progresivo de la información disponible sobre las propiedades toxicológicas de las sustancias químicas ha supuesto la constatación de un incremento en el número de agentes susceptibles de interaccionar y provocar efectos en el sistema nervioso. Se estima que entre un 3-28% de todos los productos químicos comercializados pueden ser neurotóxicos (Dorman *et al.*, 2002).

La neurotoxicidad es un término que hace referencia a aquellas alteraciones funcionales, estructurales y bioquímicas producidas en el sistema nervioso y que conllevan la manifestación de diferentes clases de efectos adversos como consecuencia de una exposición a un producto químico. Ya ha sido sumamente comprobado que la exposición a determinadas sustancias tóxicas de uso agrícola e industrial puede dañar el

sistema nervioso, con los consiguientes daños neurológicos y conductuales. Los síntomas de neurotoxicidad incluyen, entre otros, debilidad muscular, pérdida de sensibilidad y control motor, temblores, alteraciones de la cognición y trastornos en el funcionamiento del SNC y autónomo. El SNC está compuesto por el cerebro y la médula espinal y es responsable de las funciones superiores del sistema nervioso (reflejos condicionados, aprendizaje, memoria, juicio y otras funciones de la mente). Las sustancias químicas tóxicas para el SNC pueden inducir confusión, fatiga, irritabilidad y otros cambios del comportamiento, así como también enfermedades cerebrales y degenerativas (encefalopatías). La elevada complejidad del sistema nervioso se debe a que las distintas regiones están relacionadas entre sí de forma anatómica y funcional, de forma que los efectos en un área pueden manifestarse en distintas zonas del sistema nervioso (Toga, 1997).

En relación al insecticida objeto de nuestro estudio, en la literatura científica nos encontramos con un estudio de neurotoxicidad aguda en ratas tratadas con deltametrín en aceite de maíz por vía oral con una única administración a dosis de 0, 5, 15 y 50 mg/kg p.c. que puso de manifiesto la afectación de los dominios funcionales sensitivo-motor, autonómico, neuromuscular, fisiológico, actividad locomotora y excitabilidad a dosis de 50 mg/kg p.c. Los efectos alcanzaron su nivel máximo a las 3 horas del tratamiento, y fueron transitorios. Los animales fueron evaluados mediante una batería de pruebas de comportamiento, junto con un examen neuropatológico de tejidos nerviosos centrales y periféricos. Se determinó un NOAEL neurotóxico de 5 mg/kg p.c., en base a los efectos observados en la batería de pruebas de comportamiento y en la actividad motora a la dosis de 15 mg deltametrín /kg p.c. (EFSA, 2009).

Otros ensayos han estudiado la neurotoxicidad del deltametrín en ratas, destacando los siguientes efectos neurotóxicos:

- Descenso dosis-dependiente de la actividad motora, tras su administración oral (Wolanski *et al.*, 2006; Wolanski y Harrill, 2008).
- Disminución de la amplitud del reflejo de sobresalto acústico, con incremento del período de latencia al inicio, tras su administración oral (Crofton y Reiter, 1984, 1988ab).
- Reducción de la capacidad de aprendizaje y pérdida de memoria de comportamientos previamente aprendidos, tras su administración oral e intraperitoneal (Bloom *et al.*, 1983; Glowa, 1986; Stein *et al.*, 1987; Husain *et al.*, 1996).

De forma global se puede afirmar que hay dos tipos de neurotransmisores: un grupo de más de 100 neuropéptidos diferentes, entre los que se encuentran la β -endorfina, la sustancia P, la somatostatina, el neuropéptido Y, el factor liberador de gonadotropinas (GnRH), etc.; y un grupo de neurotransmisores de molécula pequeña, en el que se encuadran las aminas biógenas (las catecolaminas noradrenalina y dopamina y la indolamina serotonina), los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, GABA y taurina, y finalmente, la acetilcolina. A este nivel existe una limitada información sobre los efectos neuroquímicos del deltametrín. Se ha observado un descenso significativo de los niveles de acetilcolina en el cerebro de ratas, y todavía más significativos en el cerebelo (Aldridge *et al.*, 1978). Otro efecto descrito para el deltametrín en el cerebelo es el incremento de los niveles de GMP_C (Aldridge *et al.*, 1978; Brodie y Aldridge, 1982; Brodie y Opacka, 1987). Además, a dosis subletales, los niveles de glucosa y el flujo sanguíneo se elevan en todas las áreas cerebrales de la rata excepto en el cerebelo,

en el que se produce su depleción, indicando su elevado uso en esta región (Cremer *et al.*, 1983).

Debido al interés actual del conocimiento de los efectos de los piretroides a nivel de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA y de las aminas biógenas noradrenalina, dopamina, serotonina, a continuación se presentan estas estructuras con su modo de acción.

Aminoácidos neurotransmisores

Glutamina

La glutamina (Gln), hasta hace unos años clasificada como un aminoácido “no esencial”, ha sido reclasificada como “condicionalmente esencial” durante la última década, ya que su demanda fisiológica normalmente excede a la capacidad celular para sintetizarla endógenamente durante períodos de enfermedad (Fuchs y Bode, 2006; Varol *et al.*, 2016). La concentración intracelular de glutamina es del orden de 2-20 mM (Newsholme *et al.*, 2003a) mientras que en el medio extracelular su concentración es aproximadamente de 0,7 mM (Newsholme *et al.*, 2003b).

El metabolismo intracelular de este aminoácido es muy rápido (Darmaun *et al.*, 1986), pero además es un intermediario metabólico en la síntesis de otros aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos y proteínas (Labow y Souba, 2000), resultando esencial para el metabolismo celular (Bode, 2001). Participa en el ciclo metabólico del glutamato y del GABA (Danbolt, 2001). Así, el glutamato secretado desde los axones terminales es captado por las terminaciones nerviosas de los astrocitos y metabolizado dando lugar a

la glutamina por la glutamina sintetasa. Esta glutamina es liberada al espacio extracelular y captada por las terminaciones nerviosas. Una vez en el interior neuronal, se metaboliza dando lugar al glutamato por la glutaminasa fosfato activada (Danbolt, 2001). Paralelamente, el glutamato puede ser también descarboxilado dando lugar al GABA (Bradford *et al.*, 1983). De hecho, la glutamina está considerada como el precursor principal de la síntesis de glutamato y GABA en el astrocito (Waagepetersen *et al.*, 2003). Este ciclo reúne las dos condiciones para que se produzca la neurotransmisión glutamatérgica: una rápida eliminación del glutamato secretado en la hendidura sináptica y la recaptación del glutamato en neuronas en forma de su inmediato precursor, la glutamina (Zwingmann y Butterworth, 2005).

La glutamina controla el volumen celular (Gazzola *et al.*, 1991). Su homeostasis corporal es mantenida por los enzimas glutamina sintetasa ($\text{glutamato} + \text{NH}_3 + \text{ATP} \rightarrow \text{glutamina}$) y glutaminasa ($\text{glutamina} \rightarrow \text{glutamato} + \text{NH}_3$) (Labow *et al.*, 2001).

Se sabe que la glutamina tiene un papel esencial en muchos procesos celulares específicos: metabolismo (fuente de energía mediante procesos oxidativos en la respiración celular, precursor en la gluconeogénesis y precursor lipogénico), integridad celular (apoptosis, proliferación celular), síntesis proteica y degradación, potencial redox, secreción de insulina y síntesis de la matriz extracelular (MEC) (Curi *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la glutamina participa en la regulación de muchos genes relacionados con el metabolismo, la transducción de señales, la defensa y reparación celular, y en la activación intracelular de sistemas de transducción de señales (tejidos (Curi *et al.*, 2005).

La glutamina resulta fundamental en el mantenimiento de las funciones de diversos órganos y células: hígado (De Souza *et al.*, 2001), intestino (Ramos *et al.*, 2002), riñón (Conjard *et al.*, 2002), corazón (Khogali *et al.*, 2002), neuronas (Mates *et al.*, 2002), linfocitos (Curi *et al.*, 1999), macrófagos (Newsholme *et al.*, 1986), neutrófilos (Pithon-Curi *et al.*, 2003), células β -pancreáticas (Malaisse *et al.*, 1980) y tejido adiposo (Kowalchuk *et al.*, 1988). Bajo ciertas condiciones es una fuente de energía para células y tejidos (Curi *et al.*, 2005). Indirectamente, la glutamina tiene un papel protector frente al estrés oxidativo celular (Mates *et al.*, 2002; Gündüz, *et al.*, 2015), ya que el tripéptido glutathion (GSH) participa activamente en esta función protectora, está constituido por glutamato, glicina, y cisteína, y la glutamina es esencial en la síntesis de glutamato. Además, tiene cierta capacidad antiapoptótica (Petronini *et al.*, 1996), posiblemente relacionada con la supervivencia de las células linfoides, de enterocitos y de células cancerosas (Fuchs y Bode, 2006). Cabe destacar su acción a nivel inmunológico (Melis *et al.*, 2004), ya que este aminoácido se requiere para eventos tardíos de activación de las células T, para la progresión del ciclo celular de los linfocitos, (Horig *et al.*, 1993) y protege a los linfocitos T humanos frente a la apoptosis (Chang *et al.*, 2002).

Glutamato y aspartato

Los aminoácidos L-glutamato (Glu) y L-aspartato (Asp) son los neurotransmisores excitadores más abundantes del SNC (Von Bohlen y Dermietzel, 2002; Guillem *et al.*, 2015). Ambos se sintetizan intracerebralmente, ya que ningún aminoácido puede atravesar la barrera hematoencefálica.

El aspartato es un aminoácido endógeno presente en tejido nervioso y endocrino de vertebrados e invertebrados (D'Aniello *et al.*, 2000), así como en la glándula pineal (Schell *et al.*, 1997). Se encuentra en elevadas concentraciones en los órganos del eje hipotalámico-hipofisario-testicular (D'Aniello *et al.*, 1996), regulando la actividad del sistema reproductor (D'Aniello *et al.*, 2000).

El glutamato es sintetizado en el ciclo de Krebs gracias al glutamato deshidrogenasa, o bien por transaminación del α -cetoglutarato. Se sintetiza en las terminales nerviosas, acumulándose en las vesículas sinápticas o bien liberándose a la hendidura sináptica, y posteriormente, puede volver a penetrar en los terminales presinápticos mediante recaptación, o en los astrocitos adyacentes gracias a transportadores de membrana (Von Bohlen y Dermietzel, 2002). Además, el glutamato, mediante descarboxilación, da lugar al GABA, reacción catalizada por el ácido glutamato descarboxilasa.

Las neuronas glutamatérgicas son particularmente abundantes en la corteza cerebral, desde donde proyectan hacia diversas estructuras subcorticales como el hipocampo, el complejo basolateral de la amígdala, sustancia negra, núcleo accumbens, núcleo caudado, el núcleo rojo y la médula-puente. (Von Bohlen y Dermietzel, 2002). También se han descrito vías glutamatérgicas intrínsecas en el hipocampo, así como proyecciones glutamatérgicas que van desde el hipocampo hacia el hipotálamo, el núcleo accumbens y el septum lateral (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Hay varios tipos de moléculas transportadoras de glutamato involucradas en la captación del aminoácido hacia el interior de las vesículas de almacenamiento (VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3) (Gras *et al.*, 2002), hecho importante en la

regulación de la actividad glutamatérgica (Hertz, 2006). Además, el glutamato también es secretado por los astrocitos, células que contienen vesículas de almacenamiento y transportadores vesiculares de glutamato (Kang *et al.*, 2005).

Los receptores glutamatérgicos se dividen en dos subtipos principalmente:

- Ionotrópicos (acoplados a un canal iónico), que se subdividen en tres categorías en función de su selectividad por distintos agonistas: el receptor del N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA) y el receptor del ácido kaínico (KA) (Michaelis, 1998). Los canales formados por los receptores AMPA y el KA son primariamente permeables a Na^+ y K^+ . Ambos intervienen en la transmisión sináptica rápida del SNC, mientras que los receptores NMDA median la transmisión sináptica excitatoria lenta. Estos últimos están acoplados a canales de calcio, y para ser activados por el glutamato, la neurona postsináptica debe estar fuertemente despolarizada. Cuando este canal iónico se abre, el Ca^{2+} entra en la célula y activa distintos procesos intracelulares que conducen a la fosforilación de kinasas dependientes de Ca^{2+} /calmodulina (Bliss y Collingridge, 1993).
- Metabotrópicos (asociados a una proteína transmembrana acoplada a diferentes sistemas de segundos mensajeros) (mGluR) (Michaelis, 1998). Están acoplados a proteínas G y controlan la actividad de enzimas de membrana y de canales iónicos. Se conocen 8 subtipos en función de sus segundos mensajeros y de sus agonistas (Tanabe *et al.*, 1992), clasificándose en tres grupos: grupo I (mGluR1 y mGluR5), grupo II (mGluR2 y mGluR3), y grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, y mGluR8) (Bruno *et al.*, 2000). La activación de los receptores del grupo I conlleva una excitación neuronal ya que se localizan postsinápticamente.

En cambio, los receptores de los grupos II y III son presinápticos y al ser activados, descende la liberación de glutamato, lo que conlleva cierta inhibición neuronal (Shigemoto *et al.*, 1997). En conjunto, puede afirmarse que en el SNC la transmisión sináptica excitatoria más rápida es la mediada por los receptores mGluR (Barnstable *et al.*, 2004).

En general, la toxicidad de los aminoácidos excitadores se debe principalmente a la activación de receptores NMDA, lo que conlleva la entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular, con la posible sobrecarga intracelular de este ión (Greene y Greenamyre, 1996). Esto puede conllevar una activación indiscriminada de las señales dependientes de calcio, como por ejemplo, la activación de fosfolipasas y proteasas, y conducir a situaciones de estrés oxidativo por el aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Además, la sobreestimulación de los receptores AMPA/KA también induce muerte celular por excitotoxicidad, ya que su activación permite indirectamente que entre calcio en la célula a través del canal asociado al receptor NMDA.

Por último, indicar que la disfunción de las vías glutamatérgicas ha sido relacionada con diversas enfermedades degenerativas: Alzheimer (Sze *et al.*, 2001), esquizofrenia (Trudeau, 2004), esclerosis lateral amiotrófica (Trotti *et al.*, 2001) y Parkinson (Jonkers *et al.*, 2002).

GABA

El GABA es el neurotransmisor inhibitor predominante en el SNC de mamíferos (Owens y Kriegstein, 2002; El Isidri *et al.*, 2013). Las células GABAérgicas se

encuentran a nivel cerebral en el globo pálido, la sustancia negra (*pars reticularis*), el cerebelo, el tálamo, el hipocampo, la corteza cerebral etc. (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

El GABA se sintetiza a partir del glutamato mediante descarboxilación, reacción en la que interviene el glutamato decarboxilasa (GAD), enzima que presenta dos isoformas (GAD65 y GAD67) y cuyo cofactor es el piridoxal fosfato (Von Bohlen y Dermietzel, 2002; Dere *et al.*, 2007). Una vez sintetizado, se almacena en las vesículas sinápticas mediante un transportador vesicular (VGAT) (Fon y Edwards, 2001). Posteriormente, es liberado desde las terminaciones de neuronas inhibitoras específicas hacia la hendidura sináptica mediante exocitosis, mecanismo dependiente de calcio (Owens y Kriegstein, 2002). Más tarde, El GABA se une a sus receptores e induce un aumento de la permeabilidad de la membrana a los iones Cl^- , con la consiguiente hiperpolarización de la membrana postsináptica (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Se han identificado tres tipos de receptores de GABA:

- GABA_A : receptores ionotrópicos, que intervienen en respuestas rápidas. Son dependientes de Cl^- y median inhibiciones pre y postsinápticas (Owens y Kriegstein, 2002). Presentan distribución ubicua en el SNC, SNP y en alguna fibra nerviosa desmielinizada (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).
- GABA_B : receptores metabotrópicos, y median respuestas lentas (Connors *et al.*, 1988). Intervienen en respuestas cerebrales no dependientes de Cl^- mediante la activación de proteínas G heterotriméricas (Levine, 1999). Se localizan en neuronas y células de la glía; principalmente en cortex cerebral, tálamo, cerebelo y en el asta dorsal de la médula espinal. Se han identificado en el SNP, en fibras

desmielinizadas y en algunas células musculares lisas (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

- GABA_C: canal iónico cloro-selectivo, puede considerarse como una variante farmacológica de los receptores GABA_A (Bormann, 2000). Se encuentran en neuronas bipolares y horizontales de la retina y en hipófisis (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

En la hendidura sináptica, el GABA interacciona con sus receptores, y es eliminado mediante transportadores específicos, localizados en la membrana plasmática de neuronas GABAérgicas (transportadores GAT-1 y GAT-4) y de las células de la glía (transportadores GAT-2 y GAT-3) (Von Bohlen y Dermietzel, 2002). Una vez en el interior de la neurona o de la célula de la glía, el GABA sufre una transaminación, catalizada por el GABA transaminasa, reacción en la que interviene el α -cetoglutarato y en la que se forma ácido succínico semialdehído y glutamato. El ácido succínico semialdehído es rápidamente metabolizado a ácido succínico, intermediario del ciclo de Krebs (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Por otro lado, el GABA se ha relacionado con diversas patologías, como alteraciones motoras y cognitivas, en trastornos neurológicos y psiquiátricos, como la epilepsia, la esquizofrenia, los trastornos del sueño, el Parkinson, etc. (Luján, 2004).

Ciclo glutamina-glutamato-GABA

Como señalamos anteriormente, la glutamina participa en el reciclaje del glutamato y del GABA (Danbolt, 2001). El ciclo metabólico del primero está modulado por complejos mecanismos, ejerciendo un papel decisivo el ciclo glutamato–glutamina. De

hecho, el glutamato es secretado por los terminales axónicos y es captado del espacio extracelular por células circundantes de la astroglia, donde es transformado en glutamina mediante la glutamina sintetasa. A su vez, esta glutamina es secretada al fluido extracelular y captada por neuronas glutamatérgicas o GABAérgicas, donde es reconvertida a glutamato mediante la glutaminasa (Danbolt, 2001).

El GABA, una vez sintetizado a partir del glutamato en la neurona GABAérgica, es secretado hacia la hendidura sináptica mediante el transportador GAT-1 (Conti *et al.*, 2004), desde donde es captado por células de la glía, en las que se metaboliza dando glutamato, que posteriormente, gracias a la glutamina sintetasa, da lugar a glutamina, que será secretada y captada por la neurona GABAérgica, para obtener glutamato, cerrándose así el ciclo metabólico glutamina-glutamato-GABA (Figura 8).

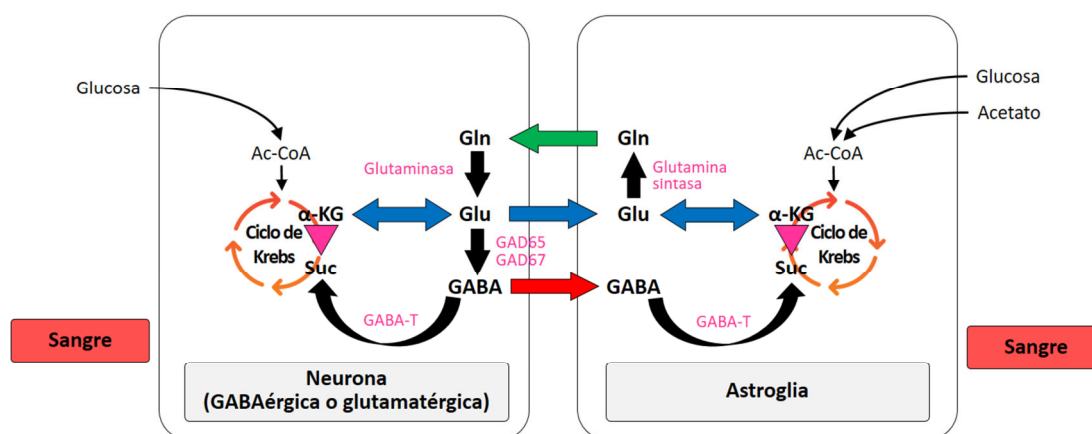


Figura 8. Ciclo glutamina-glutamato-GABA (Zwingmann y Butterworth, 2005)

Taurina

El ácido 2-aminoetanosulfónico, también denominado taurina (Tau), es un aminoácido no proteico que abunda en tejidos de mamíferos (Albrecht y Schousboe, 2005). La

concentración intracerebral de este aminoácido es muy elevada (3-9 mM, según la región cerebral) pero inferior a la del glutamato (Palkovits *et al.*, 1986; Paula-Lima *et al.*, 2013). Es un aminoácido esencial para el desarrollo y supervivencia de las células nerviosas (Sturman, 1993) y entre sus funciones más importantes cabe destacar las siguientes:

- Actúa como neurotransmisor (Okamoto *et al.*, 1983).
- Es un factor trófico en el desarrollo del SNC (Sturman, 1993) y de la retina (Lima y Cubillos, 1998).
- Mantiene la homeostasis del calcio (Lambardini, 1985) y la estabilidad de membranas (Moran, 1987).
- Regula la actividad neuronal (Saransaari y Oja, 1992), la actividad cardiovascular (Pion *et al.*, 1987), la actividad del sistema endocrinológico y del inmunitario (Sturman, 1993), y la presión arterial (Meeley *et al.*, 1989).
- Es un compuesto neuroprotector (Saransaari y Oja, 2000; Amorini *et al.*, 2017):
 - Protege a las neuronas de la excitotoxicidad inducida por aminoácidos excitadores, como el glutamato, al inhibir la despolarización neuronal inducida por este aminoácido a través de la apertura de canales de cloro (Saransaari y Oja, 2000).
 - Previene el daño metabólico derivado de la isquemia e hipoxia (Schurr *et al.*, 1987).
- Está involucrada en la osmorregulación.
- Posee capacidad antioxidante (Aruoma *et al.*, 1988; Green *et al.*, 1991), al neutralizar radicales superóxido y otras especies reactivas del oxígeno, y prevenir el daño celular causado por los radicales libres (Ebrahim y Sakthisekaran, 1997), como son los cambios en la permeabilidad de membrana

(Neal *et al.*, 1999). Además, la hipotaurina (metabolito intermediario en la síntesis de la taurina) es un agente antioxidante de radicales libres (Aruoma *et al.*, 1988): mitiga los efectos de los oxidantes secretados por los neutrófilos humanos (Green *et al.*, 1991), inhibe la peroxidación lipídica (Tadolini *et al.*, 1995) y previene la inactivación de la superóxido dismutasa por el peróxido de hidrógeno (Pecci *et al.*, 2000). También protege el tracto reproductor masculino frente al daño oxidativo (Holmes *et al.*, 1992).

La taurina principalmente se sintetiza en el SNC a partir de cisteína mediante la siguiente ruta metabólica: El grupo sulfhidrilo de la cisteína es oxidado por la cisteína dioxigenasa, produciendo ácido cisteín sulfinico (Yamaguchi *et al.*, 1978). Este ácido es descarboxilado por el ácido cisteín sulfinico descarboxilasa (Huxtable, 1989) produciendo hipotaurina. La hipotaurina es oxidada dando lugar a taurina, reacción catalizada por la hipotaurina deshidrogenasa (Huxtable, 1989). Además se han propuesto otras dos vías metabólicas para sintetizar taurina en el SNC:

- A través de una cisteamina dioxigenasa, de escasa importancia, ya que en condiciones fisiológicas la actividad de este enzima en cerebro es muy baja (Dominy *et al.*, 2004).
- Mediante la descarboxilación del ácido cisteico, sintetizado a partir de la cisteína (Dominy *et al.*, 2004), dando lugar a la taurina (Wu, 1982).

Una vez sintetizada, la taurina es secretada a la hendidura sináptica por transportadores dependientes de Na^+ y Cl^- (Saransaari y Oja, 2006). Esta secreción es modulada por segundos mensajeros (AMP_c) y por fosfolipasas (Saransaari y Oja, 2006) y se lleva a cabo por un mecanismo que precisa la entrada de Ca^{2+} , o bien por otro no dependiente

de este ión (Saransaari y Oja, 1992). Por otro lado, la liberación de taurina está fuertemente estimulada por ella misma y por análogos estructurales del GABA (Saransaari y Oja, 1992), ya que la taurina puede interactuar con transportadores de GABA (Palacin *et al.*, 1998).

Aminas biógenas

Las aminas biógenas o catecolaminas (dopamina, epinefrina y noradrenalina) son neurotransmisores de molécula pequeña, cuya estructura química común consta de un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo adyacentes y una cadena lateral etilamina. Las catecolaminas se sintetizan en las terminaciones nerviosas, y tanto la dopamina como la noradrenalina se producen a partir de un mismo precursor, el aminoácido L-tirosina, que mediante la tirosina hidroxilasa (enzima limitante) da lugar a la síntesis por hidroxilación de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), en presencia de cofactores tales como la tetrabiopterina y el oxígeno molecular. Todas las enzimas que actúan en la síntesis de las aminas biógenas se producen en el soma de las neuronas presinápticas, y son transportadas a través del axón mediante un transporte axónico lento (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Dopamina

Cuando la L-DOPA es descarboxilada por la L-aminoácidos aromático descarboxilasa, se produce la dopamina (DA), que se almacena en vesículas para, bien ser metabolizada en el citoplasma, bien ser liberada en la hendidura sináptica y unirse a sus receptores específicos (D₁ y D₂, subdivididos a su vez en varios subtipos) (Hoffman *et al.*, 1996; Fox y Wightman, 2017). Cuando se activan los receptores D₁, se activa la adenilato-

ciclasa, con el consiguiente aumento de la concentración de adenosin monofosfato cíclico (AMP_c). Por el contrario, la activación de los receptores D₂, inhibe la adenilato-ciclasa. Además, la dopamina puede abrir los canales de potasio, bloqueando los canales de calcio e inhibiendo la ruta de los fosfatidil-inositoles (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Sin embargo, la dopamina liberada a la hendidura sináptica puede ser inactivada por recaptación mediante transportadores específicos, o por inactivación extracelular. Finalmente, puede metabolizarse en la hendidura sináptica, en el citoplasma de los nervios terminales o en las células gliales. Las principales enzimas que intervienen en su metabolismo son la monoamino oxidasa (MAO), la catecol-O-metiltransferasa (COMT) y la aldehído deshidrogenasa (AH), y los metabolitos que se obtienen son el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), la 3-metoxitiramina (3-MT) y el ácido homovalínico (HVA).

Los transportadores de dopamina son glicoproteínas de 619 aminoácidos cuya función es recuperar la dopamina extracelular en los terminales presinápticos, y regular su vida media. En la recaptación, la dopamina es transportada al interior celular mediante un transporte dependiente de sodio y cloro, reaccumulándose un 80% de la dopamina secretada (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

En función de la longitud de sus proyecciones, las neuronas dopaminérgicas se clasifican en tres tipos (Von Bohlen y Dermietzel, 2002):

- Proyecciones ultracortas: localizadas en retina y bulbo olfatorio.
- Proyecciones cortas: se dividen en tres tipos:

- Sistema tuberoinfundibular: compuesto por células del núcleo arcuato del hipotálamo que se proyectan a la eminencia media y a la hipófisis.
- Sistema intradiencefálico: compuesto por células del hipotálamo posterior, la *zona incerta* y el núcleo paraventricular del hipotálamo.
- Sistema de neuronas dopaminérgicas del núcleo del *tractus solitarius* y de la sustancia gris periacueductal.
- Proyecciones largas o sistema mesotelencefálico: se originan en la sustancia negra y el área tegmental ventral, para luego proyectar al cuerpo estriado, las áreas límbicas y áreas de la corteza cerebral, denominándose sistemas de proyección mesoestriatal, mesolímbica y mesocortical, respectivamente (Cooper *et al.*, 1996).

Las neuronas dopaminérgicas son muy importantes en la regulación de muchos aspectos de la función cerebral básica, aún a pesar de representar menos del 1% de las neuronas cerebrales (Chinta y Andersen, 2005). Además de actuar como un neurotransmisor clásico en el SNC y SNP, la dopamina también actúa como una sustancia secretada de modo paracrino, autocrino y endocrino en la periferia de tejidos no neuronales, modulando: la presión sanguínea (Jose *et al.*, 2003), las funciones psicomotoras (Sasa *et al.*, 2003), la fisiología del aprendizaje y la memoria (Gulpinar y Yegen, 2004). Asimismo, está relacionada con el estrés (Gulpinar y Yegen, 2004) y tiene un papel primordial en el sistema de recompensa que controla el aprendizaje de muchos comportamientos concretos (Chinta y Andersen, 2005).

Noradrenalina

Se sintetiza a partir de la dopamina mediante la enzima dopamina- β -hidroxilasa (que se localiza en la membrana de los gránulos que acumulan las catecolaminas) y se almacena en gránulos junto a adenosin-trifosfato (ATP) en una proporción aproximada de 4:1 (noradrenalina/ATP) (Cooper *et al.*, 1996). Además, si la noradrenalina (NA) se metila, gracias a la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa, origina adrenalina.

Al liberarse, la noradrenalina interacciona con los adrenorreceptores de las membranas neuronales del SNC y SNP, de glándulas periféricas y de células musculares. Existen tres tipos de adrenorreceptores (α_1 , α_2 y β) que se subdividen a su vez en tres subtipos cada uno. Todos ellos están acoplados a proteínas G, si bien los receptores α_1 usan el ión Ca^{2+} como segundo mensajero, y los receptores α_2 y β , el AMP_C (Von Bohlen y Dermietzel, 2002). La liberación de noradrenalina tiende a aumentar la actividad excitatoria cerebral, y se cree que las vías noradrenérgicas están especialmente implicadas en el control de funciones tales como la atención y la excitación. Asimismo, interviene de forma fundamental en el sistema nervioso simpático, que coordina la respuesta de “lucha o escape”, de manera que los cambios en la actividad noradrenérgica pueden conllevar cambios en funciones como la frecuencia cardiaca, la tensión arterial, la actividad gastrointestinal, etc (Fox y Wightman, 2017).

La noradrenalina se inactiva por recaptación mediada por transportadores desde la hendidura sináptica hacia el interior celular, donde es metabolizada. La actividad de estos transportadores depende del gradiente de Na^+ transmembrana. En el metabolismo intervienen las enzimas COMT (transfiriendo el grupo metilo de la S-adenosilmetionina

a la noradrenalina, e inactivando así su sustrato) y/o MAO mitocondrial (dando lugar al ácido 3,4-dihidroxi mandélico) (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Las células noradrenérgicas se concentran mayoritariamente en el *locus coeruleus* y en el *locus subcoeruleus*, además de en ciertas áreas del sistema reticular y en el núcleo del tracto solitario. El *locus coeruleus* es la fuente de proyecciones noradrenérgicas difusas que inervan la corteza cerebral, el sistema límbico (hipocampo, amígdala y septum), el tálamo, el hipotálamo y la médula espinal (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

Serotonina

La serotonina (5-HT) es una indolamina cuyo precursor es el triptófano, siendo la disponibilidad de este aminoácido el factor limitante en su síntesis. El triptófano atraviesa la barrera hematoencefálica a través de un sistema de transporte activo facilitado por la presencia de glucosa e insulina, y compitiendo con la leucina, lisina y metionina. Cuando el almacenamiento intracelular de triptófano se agota, la síntesis de serotonina cesa. Asimismo, un exceso de triptófano conlleva un aumento de la síntesis serotoninérgica (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

La enzima triptófano hidroxilasa transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP) en presencia de oxígeno molecular y un donador de protones (tetrahidropterina). A continuación, el 5-HTP es descarboxilado por el aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), dando lugar a la serotonina. Esta misma enzima es capaz también de descarboxilar la DOPA, producto intermedio de la síntesis de dopamina. Algunas neuronas serotoninérgicas sintetizan también sustancia P, hormona liberadora de tirotrina, encefalinas, óxido nítrico-sintasa, galanina, etc. (Xu y Hökfelt, 1997).

Se ha caracterizado un importante número de receptores serotoninérgicos, contabilizándose en la actualidad 14 subtipos distintos (5-HT₁ – 5-HT₇) (Hoyer *et al.*, 1994). Todos ellos son receptores acoplados a proteínas G (receptores metabotrópicos), excepto el receptor 5-HT₃, que forma un canal iónico y pertenece, por tanto, a la familia de receptores ionotrópicos (Peters *et al.*, 1992). A excepción de este receptor, el resto tienen una estructura con siete dominios transmembranales, con un extremo amino-terminal en el exterior de la membrana celular y un extremo carboxi-terminal en el interior.

La serotonina se inactiva por metabolización y/o mediante recaptación desde el espacio extracelular gracias a un transportador específico, cuya actividad es dependiente del gradiente eletroquímico de Na⁺ y K⁺. En su degradación intervienen varias enzimas: la MAO_A y un aldehído deshidrogenasa. El metabolito resultante es el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), que se elimina a través de la orina.

Las neuronas serotoninérgicas se localizan en grupos discretos en el rafe, protuberancia y tronco encefálico superior. Estas células envían proyecciones difusas hacia la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, los ganglios basales, el núcleo geniculado lateral, el núcleo supraquiasmático, el *tectum opticum*, la sustancia gelatinosa y el asta ventral de la médula espinal (Von Bohlen y Dermietzel, 2002).

La serotonina está implicada en casi todas las funciones cerebrales, ejerciendo una acción inhibitoria directa (Yu *et al.*, 2001), o indirectamente a través de la estimulación de la síntesis de GABA (Kang *et al.*, 2002). Las principales funciones que regula son: modular las fases III y IV del sueño lento (Fornal *et al.*, 1994), inhibir la secreción

hipotalámica de gonadotropinas (Moguilevsky y Wuttke, 2001), regular los ritmos endógenos circadianos y modular la actividad de los ejes hipotálamo-periféricos (Moore y Speh, 2004), y regular la temperatura corporal (Ootsuka y Blessing, 2006). Además, es el principal mediador inhibitor del núcleo hipotalámico ventro-medial que regula la ingesta y saciedad (Halford *et al.*, 2005) y es uno de los neuromoduladores de las vías nociceptivas (Akunne y Soliman, 1994). Asimismo, la serotonina modula la actividad gastrointestinal a nivel periférico (Ni y Watts, 2006).

3.4.OBJETIVOS DEL TRABAJO

Los mecanismos implicados en el desarrollo de neurotoxicidad del insecticida deltametrín no se comprenden en su totalidad a día de hoy. Diversos estudios han evaluado los efectos neurotóxicos del deltametrín (Bloom *et al.*, 1983; Crofton y Reiter, 1984, 1988ab; Glowa, 1986; Stein *et al.*, 1987; Husain *et al.*, 1996; Wolanski *et al.*, 2006; Wolanski y Harrill, 2008) y sus consecuencias neuroquímicas, que incluyen un descenso significativo de los niveles de acetilcolina en el cerebro de ratas, y todavía más significativos en el cerebelo (Aldridge *et al.*, 1978), un incremento en el cerebelo de los niveles de GMP_C (Aldridge *et al.*, 1978; Brodie y Aldridge, 1982; Brodie y Opacka, 1987), y una elevación de los niveles de glucosa y del flujo sanguíneo en todas las áreas cerebrales de la rata excepto en el cerebelo a dosis letales (Cremer *et al.*, 1983).

Existe información limitada sobre los efectos del piretroide deltametrín a nivel de estos grupos descritos de neurotransmisores, los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA, y las aminas biógenas noradrenalina, dopamina y serotonina.

Por todo ello, el presente trabajo de investigación tiene dos objetivos:

1. Estudiar los efectos del deltametrín en ratas macho adultas sobre la concentración de los neurotransmisores aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, GABA y taurina en distintas regiones cerebrales.
2. Estudiar los efectos del deltametrín en los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico en distintas regiones del SNC de ratas macho adultas.

Las regiones cerebrales objeto de estudio son: hipófisis, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo, corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo.

La elección de la rata como modelo animal experimental se basa en que estos roedores poseen una serie de ventajas para los estudios toxicológicos, como son su pequeño tamaño, fácil manejo y corto ciclo vital. Además es un modelo animal aceptado para proporcionar datos en la evaluación del riesgo para el hombre de plaguicidas. En los estudios de niveles de neurotransmisores, la rata tiene la ventaja añadida de que el tamaño de su encéfalo permite una buena localización de las distintas regiones cerebrales.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la realización del presente trabajo se han utilizado un total de 30 ratas macho Wistar, clínicamente sanas, de 7 semanas de edad (peso corporal 190-200 g), suministradas por Harlan Envigo RMS Spain, S.L. Los animales se alojaron en la zona de experimentación del Animalario de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (número de registro 28079-15 ABC-M de la Dirección General de Agricultura y Alimentación, Consejería de Economía y Empleo de la Comunidad Autónoma de Madrid). Previamente al inicio del estudio, los animales situados en la zona de experimentación del Animalario de la UCM, fueron sometidos a un período de observación y aclimatación de una semana con el fin de detectar cualquier signo clínico o comportamiento anómalo que hiciese sospechar de enfermedades que impidieran su inclusión en el protocolo experimental desarrollado. En el período indicado no se observó ningún indicio de alteraciones zootécnicas o de enfermedad que aconsejara la exclusión de ninguna rata. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales de policarbonato, con un lecho de serrín y alimentadas con una dieta para roedores y agua *ad libitum*. La temperatura del animalario fue de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa del $50 \pm 10\%$. Los animales en estas condiciones se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz de 8:00 a 20:00) y aire purificado. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid (CEEa-UCM).

4.1.1. Pautas de tratamiento y grupos experimentales

El insecticida piretroide deltametrín (pureza > 98%), plaguicida objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral fue donado por el Laboratorio Roussel Uclaf (Romainville, France).

4.1.1.1. Estudio de aminoácidos neurotransmisores

Se utilizaron 15 ratas Wistar, que se distribuyeron en los grupos experimentales que a continuación se detallan, cada uno de ellos formado por 5 ratas. El tratamiento administrado a cada grupo varió, de modo que:

1. Grupo control: Estos animales recibieron 0,5 ml/día de aceite de maíz (vehículo) por vía oral, a través de sondaje intragástrico, durante 5 días.
2. Grupo I: Animales tratados oralmente con 5 mg/kg p.c./día de deltametrín durante 5 días. Para ello, previamente se disuelve el deltametrín en aceite de maíz a una concentración de 2 mg/ml, administrando a cada animal un volumen diario de 0,5 ml. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico.
3. Grupo II: Animales tratados oralmente con 10 mg/kg p.c./día de deltametrín durante 5 días. Para ello, previamente se disuelve el deltametrín en aceite de maíz a una concentración de 4 mg/ml, administrando a cada animal un volumen diario de 0,5 ml. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico.

Las dosis de deltametrín elegidas de 5 y 10 mg/kg p.c. son dosis subletales que representan aproximadamente un 1/20 y 1/10 de la DL_{50} oral, respectivamente, y no originan mortalidad ni signos clínicos adversos en los animales. Solamente la dosis

superior originaba una leve disminución de la actividad motora reversible en unos 60 minutos tras la administración de la dosis.

El tratamiento oral de los tres grupos experimentales se realizó a las 10.00 h durante 5 días consecutivos. El alimento (pienso específico para roedores) fue retirado 6 horas antes de realizar el tratamiento, volviéndose a colocar *ad libitum* una hora después del mismo. A lo largo del experimento se determinaron el consumo diario de alimento y la variación diaria del peso de cada animal, monitorizando su comportamiento y su estado general.

4.1.1.2. Estudio de aminas biógenas

Se utilizaron 15 ratas Wistar, que se distribuyeron en los grupos experimentales que a continuación se detallan, cada uno de ellos formado por 5 ratas. El tratamiento administrado a cada grupo varió, de modo que:

1. Grupo control: Los animales recibieron 0,5 ml/día de aceite de maíz (vehículo) por vía oral, a través de sondaje intragástrico, durante 5 días.
2. Grupo I: Se le administró oralmente a cada rata 5mg/kg p.c./día de deltametrín durante 5 días. Para ello, previamente se disuelve el deltametrín en aceite de maíz a una concentración de 2 mg/ml, administrando a cada animal un volumen diario de 0,5 ml. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico.
3. Grupo II: Animales tratados oralmente con 10 mg/kg p.c./día de deltametrín durante 5 días. Para ello, previamente se disuelve el deltametrín en aceite de maíz a una concentración de 4 mg/ml, administrando a cada animal un volumen diario de 0,5 ml. El tratamiento se administró por sondaje intragástrico.

El tratamiento de los tres grupos experimentales se realizó a las 10.00h durante 5 días consecutivos. El alimento (pienso específico para roedores) fue retirado 6 horas antes de realizar el tratamiento, volviéndose a colocar *ad libitum* una hora después del mismo. A lo largo del experimento se determinaron el consumo diario de alimento y la variación diaria del peso de cada animal, monitorizando su comportamiento y su estado general.

Sacrificio de los animales, recogida y preparación de las muestras

Las 30 ratas del trabajo (5 ratas por grupo experimental en cada una de los dos estudios experimentales anteriormente descritos) se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación 24 horas después de recibir la última dosis de tratamiento. Rápidamente y en frío, se aislaron las siguientes regiones cerebrales:

- Hipófisis.
- Hipotálamo.
- Cerebelo
- Bulbo raquídeo.
- Corteza frontal.
- Hipocampo.
- Cuerpo estriado.
- Mesencéfalo.

La disección de las citadas áreas cerebrales se realizó siguiendo el método Glowinski e Iversen (1966), con algunas modificaciones introducidas por nuestro laboratorio. En primer lugar se separó el rombencéfalo mediante un corte transversal, diseccionándose la médula espinal, seguida del bulbo raquídeo y el cerebelo (Figura 9 y Figura 10). A

continuación, se aisló el hipotálamo, mediante un corte transversal a nivel del quiasma óptico hasta la comisura anterior. Después se tomó una muestra de la corteza frontal de ambos hemisferios cerebrales, y se separó el cuerpo estriado, tomando las paredes externas de los ventrículos laterales como límite interno, y el cuerpo calloso como límite externo. Por último, se aislaron el mesencéfalo y el hipocampo.

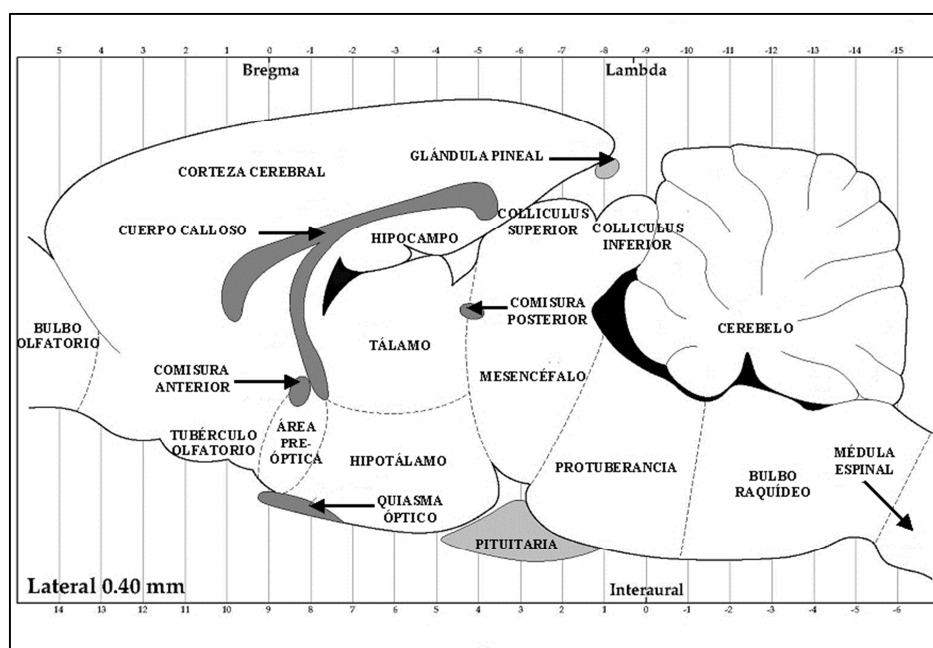


Figura 9. Representación de las distintas partes del encéfalo de la rata Wistar en un corte en el plano sagital (0,40 mm con respecto a la medial). Modificada de PARAXINOS y WATSON (1998).

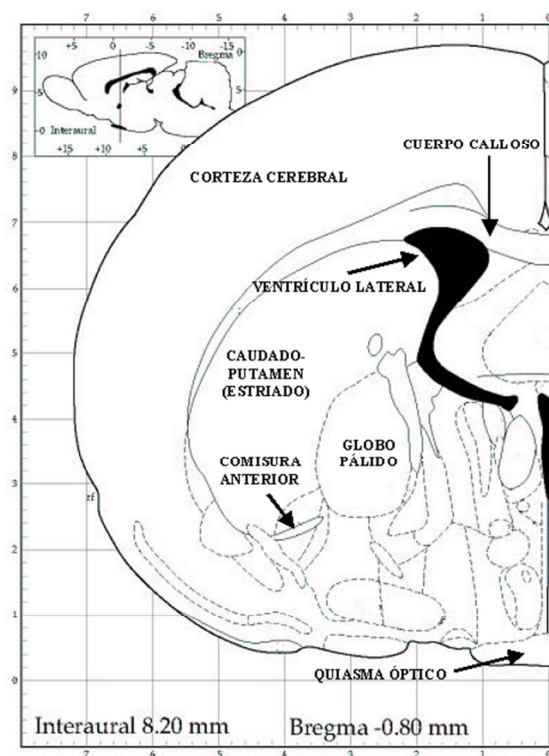


Figura 10. Representación de las distintas partes del encéfalo de la rata Wistar en un corte en el plano sagital (0,40 mm con respecto a la medial). Modificada de PARAXINOS y WATSON (1998).

4.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

Todas las determinaciones analíticas de los dos estudios experimentales se han efectuado en el Laboratorio de Toxicología del Grupo de Investigación 920204-UCM, del Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, que dispone del equipamiento necesario para el desarrollo de las técnicas analíticas utilizadas al efecto.

4.2.1. Determinación de aminoácidos neurotransmisores

Los tejidos se mantuvieron en frío durante toda su manipulación. Una vez extraídas las regiones cerebrales, se pesaron por separado y se sumergieron en ácido acético 2N, según los volúmenes descritos en la Tabla 8.

REGIONES CEREBRALES	RATAS TRATADAS (μl)
HIPÓFISIS	300
HIPOTÁLAMO	400
HIPOCAMPO	400
CUERPO ESTRIADO	400
MESENCÉFALO	800
CORTEZA CEREBRAL	400
CEREBELO	800
BULBO RAQUÍDEO	800

Tabla 8. Volúmenes de ácido acético 2N para cada una de las regiones cerebrales estudiadas.

El ácido acético provoca la desnaturalización de las enzimas responsables de la catabolización y degradación de los aminoácidos que fueron objeto de estudio en esta Tesis.

Seguidamente, las muestras se homogeneizaron en frío mediante una sonda de ultrasonidos (Labsonic U, Braun), para romper los tejidos y las células, y liberar los aminoácidos. A continuación, se centrifugaron a 11000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.

El sobrenadante se calentó a 100 °C durante 7 minutos, luego se enfrió en hielo, y después se sometió a una segunda centrifugación a 13000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, el sobrenadante obtenido se congeló a -80°C, hasta la determinación de los aminoácidos.

La determinación y cuantificación de los aminoácidos glutamato, aspartato, glutamina, taurina y GABA, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia, siguiendo el método establecido por Duvilanski *et al.* (1998), modificado por Lafuente *et al.* (2001).

La luminiscencia se define como la intensidad de luz emitida por parte de átomos o moléculas excitados electrónicamente. Para producir la excitación electrónica es necesario aportar energía, y en función del tipo de energía aportada se pueden distinguir varios tipos de luminiscencia (electroluminiscencia, quimioluminiscencia, termoluminiscencia y fotoluminiscencia). En el caso de la fotoluminiscencia, la excitación se lleva a cabo utilizando una fuente de radiación infrarroja, visible o ultravioleta. La radiación emitida tiene una longitud de onda más larga que la de la radiación absorbida. Se distinguen dos tipos de luminiscencia. Para un pequeño lapso de tiempo, $\leq 10^{-8}$ segundos, entre excitación y emisión, el proceso es conocido como fluorescencia. La fluorescencia cesa tan pronto como la fuente de excitación es retirada. Para un tiempo de decaimiento mucho más largo, el proceso es conocido como fosforescencia. Este proceso puede continuar un largo lapso de tiempo después de retirar la fuente de excitación.

La detección de los citados aminoácidos se ha llevado a cabo aprovechando la fluorescencia que éstos emiten tras una reacción de derivatización con O-phthaldialdehyde (OPA) en medio alcalino, siguiendo el método establecido por Blundell y Brydon (1987). Para cuantificar la radiación emitida al exponer a las muestras a un haz de radiación eletromagnética procedente de una lámpara de luz ultravioleta, se ha utilizado un detector de fluorescencia (Skoog y Leary, 1994).

Preparación de la disolución de OPA: La disolución de OPA 4mM y pH 9,5, con borato potásico (1,6M), metanol (10%) y 2-mercaptoetanol (2,56mM) se prepara tal y como se indica a continuación:

- Se prepara una disolución de borato potásico 1,6M y pH 9,5, adicionando 9,9 g de ácido bórico y 5,2 g de hidróxido potásico. Todo ello, se lleva a 100 ml con agua miliQ.
- Seguidamente, se toman 7,14 ml de esta disolución y se añaden 32 mg de OPA, 800 µl de metanol y 55 µl de 2-mercaptoetanol.

Reacción de derivatización: Antes de inyectar la muestra o el patrón en el sistema cromatográfico, se realiza una reacción de derivatización y se añade el patrón interno (homoserina). Para llevar a cabo la reacción de derivatización de los patrones, se adicionan sucesivamente y en el orden indicado:

- 20 µl del patrón.
- 10 µl de homoserina (patrón interno).
- 10 µl de NaOH 4N.
- 40 µl de la disolución de OPA previamente preparada.
- La mezcla se agita durante un minuto para que los aminoácidos reaccionen con la OPA.
- 20 µl de ácido acético al 5%.
- Agitar e inyectar inmediatamente el patrón en el cromatógrafo.

En el caso de las muestras, la reacción de derivatización se efectúa de acuerdo con los siguientes pasos:

- 20 µl de muestra.

- 10 µl de homoserina a una concentración de 84 µg/ml (patrón interno).
- 10 µl de NaOH 4N.
- 40 µl de la disolución de OPA previamente preparada.
- La mezcla se agita durante un minuto para que los aminoácidos reaccionen con la OPA.
- 20 µl de ácido acético al 5%.
- Agitar e inyectar inmediatamente el patrón en el cromatógrafo.

El NaOH 4N se adiciona al medio para alcalinizarlo y facilitar así la reacción posterior de la disolución de OPA con los aminoácidos de la muestra o patrón. De igual forma, el ácido acético al 5% se añade para detener dicha reacción.

Equipo cromatográfico utilizado:

- Bomba de gradiente (Shimadzu LC-20AT).
- Autoinyector, para muestras de tejidos y patrones de aminoácidos, con cargador de 20 µl.
- Columna ACE 5 C18, con diámetro de poro de 5 µm, diámetro interno de 4,6 mm y longitud de 150 mm (ACE HPLC Columns, suministrada por Symta, S.A.U.).
- Fases móviles. Se han utilizado dos fases móviles en gradiente:
 - Fase A: constituida por un tampón de acetato sódico 0,1M al 70% y metanol al 30%. El pH se ajustó a 6,75 con ácido acético glacial.
 - Fase B: constituida por metanol/agua (70% v/v).
- Detector de fluorescencia (Shimadzu RF-551).

- Desgasificador (Shimadzu DGU-20A3).
- Software informático Shimadzu LC Solution, para el estudio de los cromatogramas y el tratamiento de datos de los aminoácidos estudiados.

Las dos fases móviles se han eluido empleando una bomba de gradiente, a un flujo de 1 ml/minuto y a una presión de 140-160 bares, fijándose los siguientes parámetros (Tabla 9):

TIEMPO	CONCENTRACIÓN FASE MÓVIL
0-5 min	100% de Fase A 0% de Fase B (estabilización del sistema)
5-8 min	Aumento de 0% a 35% de Fase B
8-13 min	65% de Fase A 35% de Fase B
13-20 min	Aumento de 35% a 100% de Fase B
20-40 min	100% de Fase B (limpieza del sistema)
40-45 min	Descenso de 100% a 0% de Fase B
45-55 min	100% de Fase A 0% de Fase B

Tabla 9. Elución de las dos fases móviles mediante bomba de gradiente.

El minuto 0 se corresponde con el momento de inyectar en el sistema cromatográfico los 20 µl de la mezcla obtenida de la reacción de derivatización, ya sea la muestra o el patrón.

En el detector de fluorescencia se fijó una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 455 nm.

Las rectas de calibrado para glutamato, aspartato, glutamina, taurina y GABA fueron lineales a las concentraciones de 10,5, 21, 42, 84, 210, 420 $\mu\text{g/ml}$. Los coeficientes de variación intra-día e inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para los cinco aminoácidos. El método fue selectivo para glutamato, aspartato, glutamina, taurina y GABA, no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros compuestos endógenos propios de las muestras biológicas. A continuación se muestran varios de los cromatogramas obtenidos:

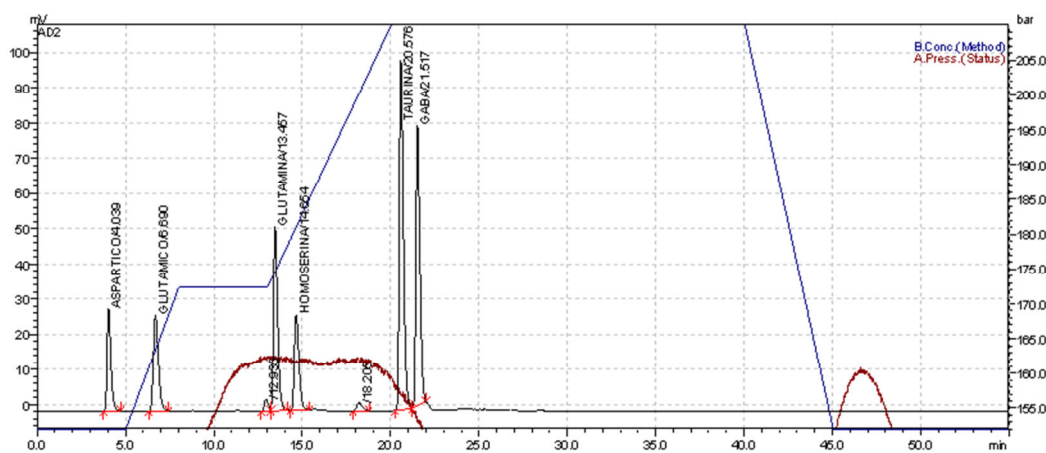


Figura 11 Cromatograma de un patrón que contiene, en orden creciente de tiempo de retención aspartato, glutamato, glutamina, homoserina (patrón interno), taurina y GABA

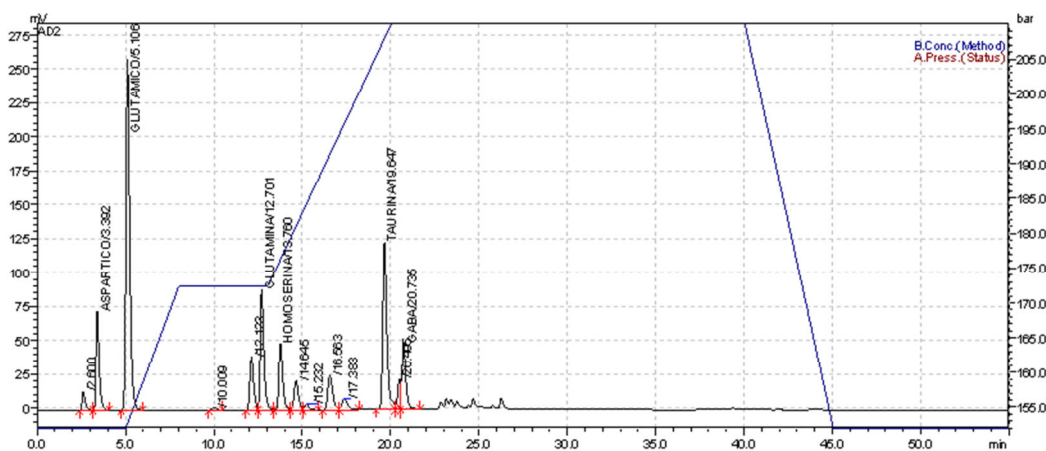


Figura 12. Cromatograma del cerebro de una rata del grupo I que contiene, en orden creciente de tiempo de retención aspartato, glutamato, glutamina, homoserina (patrón interno), taurina y GABA.

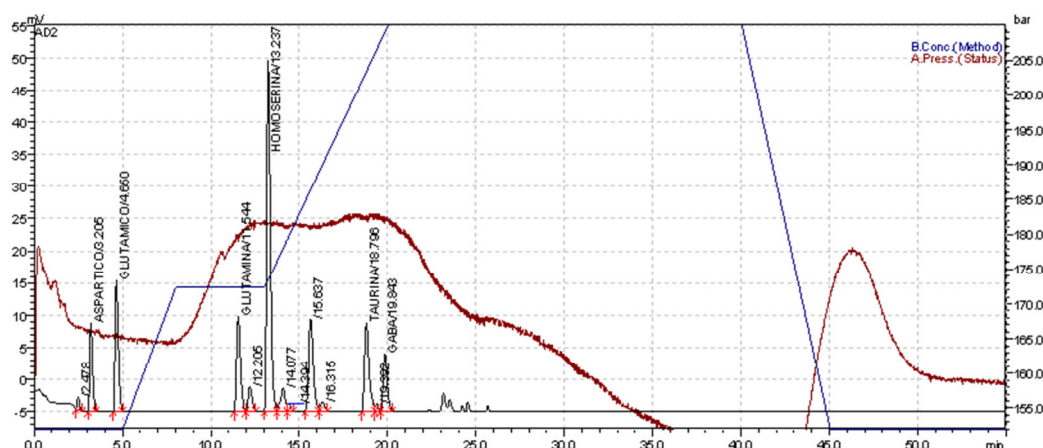


Figura 13. Cromatograma de la hipófisis de una rata del grupo II que contiene contiene, en orden creciente de tiempo de retención aspartato, glutamato, glutamina, homoserina (patrón interno), taurina y GABA.

4.2.2. Determinación de aminas biógenas

Los tejidos se mantuvieron en frío durante toda su manipulación. Cada muestra de tejido se pesó en una balanza electrónica, guardándose separadamente en tubos Eppendorf debidamente identificados. Las muestras se homogeneizaron en frío mediante una sonda de ultrasonidos durante 4 minutos a velocidad constante, en solución de ácido perclórico 0,4M y metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) al 0,1% (p/v), y en volúmenes descritos en la Tabla 10:

REGIONES CEREBRALES	RATAS TRATADAS (μl)
HIPÓFISIS	300
HIPOTÁLAMO	400
HIPOCAMPO	400
CUERPO ESTRIADO	400
MESENCÉFALO	800
CORTEZA CEREBRAL	400
CEREBELO	800
BULBO RAQUÍDEO	800

Tabla 10. Volúmenes de ácido perclórico 0,4M y metabisulfito sódico al 0,1% (p/v) para cada una de las regiones cerebrales estudiadas.

Es importante cumplir estrictamente las condiciones de homogeneización ya que la ausencia de antioxidantes como el ácido ascórbico, el perclórico en bajas concentraciones, así como la luz y temperaturas elevadas pueden descomponer las catecolaminas, y especialmente las indolaminas (Verbiese-Genard *et al.*, 1983; Cao y Hoshino, 1998). A continuación, las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. en centrífuga (Sorvall Instruments Dupont, modelo RC5C) refrigerada a 4 °C durante 20 minutos. Se recogió el sobrenadante en tubos Eppendorf y se almacenó a -80°C hasta su análisis.

En la actualidad, el método más empleado para determinar indolaminas y catecolaminas en muestras biológicas es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica, que fue utilizado por primera vez por Kissinger *et al.* (1973). Debido a su fácil manejo, y a su mayor sensibilidad, este método se ha acabado imponiendo a otras técnicas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia y ensayos radioenzimáticos.

Con el objetivo de determinar y cuantificar las aminas dopamina y serotonina y sus metabolitos, así como la noradrenalina en los tejidos del SNC aislados, hemos seguido el método descrito por Colado *et al.* (1993), con modificaciones introducidas por nuestro laboratorio (Fernández *et al.*, 1995), por su linealidad, repetitividad intra e inter día y su alta sensibilidad.

El equipo cromatográfico utilizado consta de:

- Bomba isocrática (Shimadzu modelo LC-9A).
- Autoinyector, para muestras de tejidos y patrones de aminos, con cargador de 20 μ l.
- Columna en fase reversa Teknokroma (TR-416306) Nucleosil 120 C₁₈ de 5 μ m (partícula de relleno), 12,5 cm de largo y 0,4 cm de diámetro interno.
- Detector electroquímico (Shimadzu L-ECD-6A).
- Integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A.
- Fase móvil, filtrada y desgasificada durante 15 minutos, consistente en una mezcla de los siguientes reactivos en función de la determinación analítica de interés:
 - Determinación de noradrenalina, dopamina y sus metabolitos: monofosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado 0,1 M (pH=3,5) y metanol (400:500:70 v:v:v), ácido etilendiaminotetraacético (sal disódica, dihidrato) (EDTA) 0,9 mM y ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) 1,6 mM.
 - Determinación de serotonina y sus metabolito: monofosfato disódico dihidratado (Na₂HPO₄·2H₂O) 0,1 M, ácido cítrico monohidratado 0,1 M (pH=3,5) y metanol (450:450:70 v:v:v), EDTA 0,8 mM y ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) 0,5 mM.

Determinación analítica de noradrenalina, y de dopamina y sus metabolitos, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovalínico (HVA).

Se inyectaron 20 µl de los sobrenadantes de los homogeneizados de cada una de las regiones del SNC almacenadas a -80°C en el sistema cromatográfico. Como fase móvil se utilizó la mezcla anteriormente descrita, que se preparó diariamente, empleando un flujo de 1,0 ml/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección electroquímica a un potencial fijado de +0,85 V entre el electrodo de trabajo (Glassy carbon) y el de referencia (Ag/AgCl), mediante el integrador con procesador de datos. Al trabajar en fase reversa, el tiempo de retención de los componentes más polares es menor que el de los menos polares (Skoog y Leary, 1994).

Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron usando la técnica del estándar externo mediante la utilización de soluciones estándar de referencia de DA, DOPAC, HVA y NA. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico (HClO₄) 0,4 M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico (Na₂S₂O₅).

Para las muestras de tejido nervioso de SNC, las curvas estándar fueron lineales para concentraciones en el rango de 1 ng/ml hasta 300 ng/ml para NA, DOPAC y HVA; y en el rango de 1 ng/ml hasta 1000ng/ml para DA. Los coeficientes de variación intra-día y los coeficientes de variación inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para NA, DA, DOPAC y HVA. El método fue selectivo para NA, DA, DOPAC y HVA, no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros compuestos endógenos, propios de las muestras biológicas (Figura 14 y Figura 15).

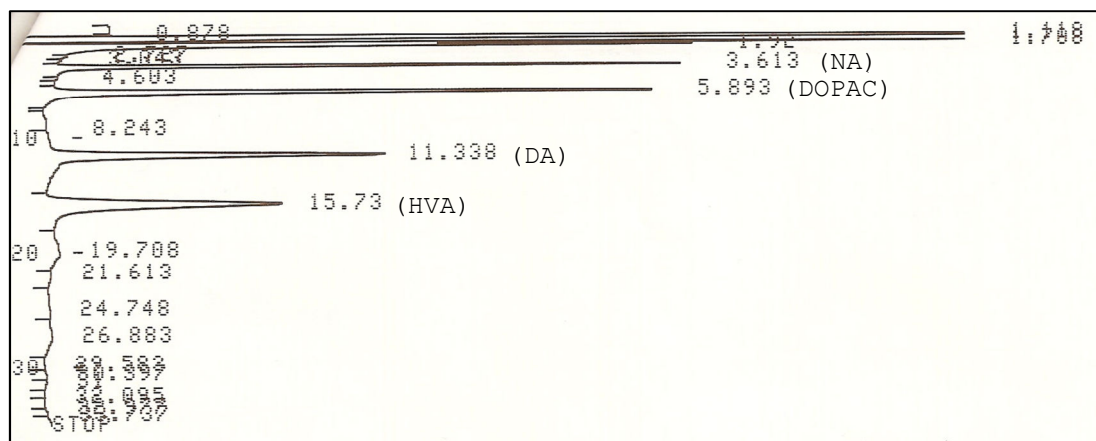


Figura 14. Cromatograma de una mezcla de estándar que contiene, por este orden, NA, DOPAC, DA y HVA.

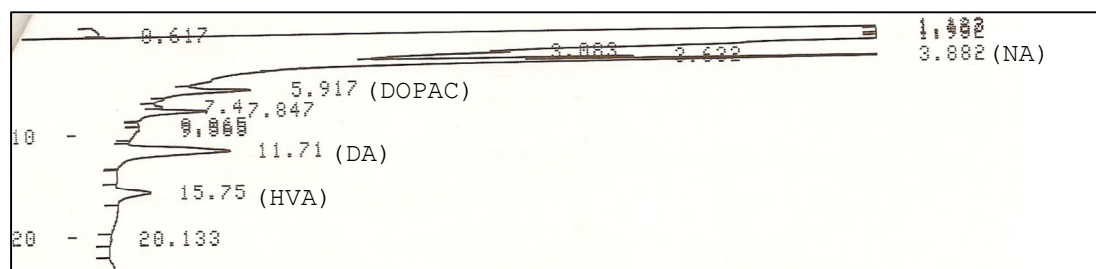


Figura 15. Cromatograma de una muestra de corteza cerebral de una rata del grupo I que contiene, por este orden, NA, DOPAC, DA y HVA.

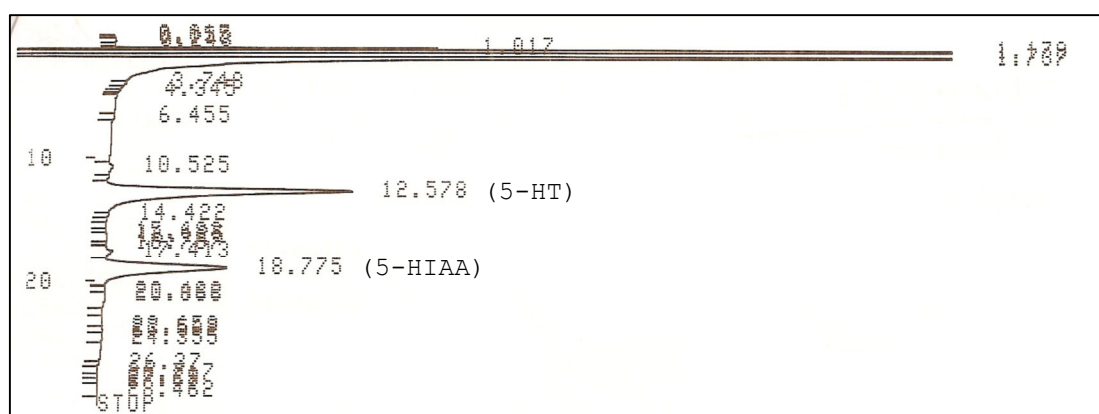
Determinación analítica de serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxi-3-indolacético (5-HIAA).

Se inyectaron 20 μ l de los sobrenadantes de los homogeneizados de cada una de las regiones del SNC almacenadas a -80°C en el sistema cromatográfico. Como fase móvil se utilizó la mezcla anteriormente descrita, que se preparó diariamente, empleando un flujo de 1,0 ml/min. El eluyente de la columna se monitorizó por detección electroquímica a un potencial fijado de +0,63 V entre el electrodo de trabajo (Glassy carbon) y el de referencia (Ag/AgCl), mediante el integrador con procesador de datos.

Las áreas de los picos de los cromatogramas se cuantificaron usando la técnica del estándar externo mediante la utilización de soluciones estándar de referencia de 5-HT y

5-HIAA. Estas soluciones estándar se prepararon en una solución de ácido perclórico (HClO_4) 0,4 M conteniendo 0,1% (p/v) de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

Para las muestras de tejido nervioso de SNC, las curvas estándar fueron lineales para concentraciones en el rango de 5 ng/ml hasta 500 ng/ml para 5-HT y 5-HIAA. Los coeficientes de variación intra-día y los coeficientes de variación inter-día fueron inferiores al 4%. En las muestras tisulares de SNC la recuperación analítica media fue del 100% para 5-HT y 5-HIAA. El método fue selectivo para 5-HT y 5-HIAA, no observándose en los cromatogramas ninguna interferencia con otros compuestos endógenos, propios de las muestras biológicas (Figura 16 y Figura 17).



4.3. REACTIVOS Y EQUIPAMIENTO

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron del más alto grado analítico, y fueron obtenidos de empresas comerciales.

- Ácido Acético (Merck).
- Hidróxido sódico (Merck).
- Ácido perclórico (Merck).
- Metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (Merck).
- 2-mercaptoetanol (Sigma).
- Aspartato (Sigma).
- Ácido bórico (Panreac).
- Ácido gamma aminobutírico (GABA) (Sigma).
- Acetato de sodio anhidro (Merck).
- Glutamato (Sigma).
- Glutamina (Sigma).
- Hidróxido potásico (Sigma).
- Homoserina, utilizada como patrón interno (Sigma).
- Metanol de grado HPLC (Lab-Scan).
- O-Phthaldialdehyde (OPA) (Sigma).
- Taurina (Sigma).
- Monofosfato disódico dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck).
- Ácido cítrico monohidratado (Merck).
- Metanol de grado HPLC (Lab-Scan).
- Ácido etilendiaminotetraacético (sal disódica, dihidrato) (EDTA) (Merck).

- Ácido 1-octanosulfónico (sal sódica) (Sigma).
- (±)-Arterenol (hidrocloruro) ([±]-norepinefrina, noradrenalina, NA) (Sigma).
- 3-hidroxitiramina (Dopamina, DA) (Sigma).
- Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Sigma).
- Ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (ácido homovalínico, HVA) (Sigma).
- 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) (Sigma).
- Ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-IAA) (Sigma).
- Ácido perclórico (Merck).

Equipamiento

- Congelador de -80°C; Angelantoni Industrie, modelo Platinum 370H.
- Balanza electrónica de precisión digital; AND ER-182^a.
- Centrífuga refrigerada; Sorvall Instruments Dupont, modelo RC5C.
- Sonda de ultrasonidos para homogeneización de tejidos; Labsonic U-Braun.
- Accublock Digital Dry Bath; Labnet International.
- Material de vidrio y plástico de uso general en laboratorio.
- Bomba de gradiente (Shimadzu LC-20AT).
- Autoinyector, con cargador de 20 µl.
- Columna separadora ACE 5 C18, con diámetro de poro de 5 µm, diámetro interno de 4,6 mm y longitud de 150 mm (ACE HPLC Columns, suministrada por Symta, S.A.U.).
- Detector de fluorescencia (Shimadzu RF-551).
- Desgasificador (Shimadzu DGU-20A3).
- Bomba isocrática (Shimadzu modelo LC-9A).

- Columna en fase reversa Teknokroma (TR-416306) Nucleosil 120 C₁₈ de 5 µm (partícula de relleno), 12,5 cm de largo y 0,4 cm de diámetro interno.
- Detector electroquímico (Shimadzu L-ECD-6A).
- Integrador con procesador de datos Shimadzu Chromatopac C-R6A.

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para realizar el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos, se ha utilizado el programa informático SPSS V. 24.0 para Windows, aplicando un ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* Dunnett. Los valores de las tablas se expresan como la media aritmética \pm el error estándar de la media ($X \pm E.S.M.$). El nivel de confianza a partir del cual las diferencias entre las medias fueron consideradas significativas fue mayor o igual del 95% ($P < 0,05$). Las diferencias entre las medias de los grupos se establecieron en tres niveles de significación: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

La administración oral de deltametrín a ratas a dosis de 5 mg y 10 mg/kg p.c./día durante 5 días consecutivos no produjo mortalidad ni ningún signo clínico adverso en ninguno de los animales. No obstante, las ratas tratadas con la dosis más alta (10 mg/kg p.c./día, 5 días) mostraron un descenso de la actividad motora con ligera incoordinación del tercio posterior, signo que fue reversible y desapareció en torno a los 60 minutos tras el tratamiento. En lo que respecta a los efectos del deltametrín sobre el incremento de peso corporal y sobre el consumo de alimento, tras los 5 días de tratamiento, se observó una disminución estadísticamente significativa en ambos parámetros tanto con la dosis oral de 5 mg/kg p.c./día como con la de 10 mg/kg p.c./día, en los dos estudios del presente trabajo (Tabla 11 y Tabla 12).

GRUPO	Incremento de peso (g)	Total alimento ingerido (g)
Grupo Control	38,40 ± 3,56	111,40 ± 3,93
Grupo I 5 mg/kg p.c.	13,40 ± 1,57*** (-65%)	83,20 ± 2,20*** (-25%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	15,00 ± 2,30*** (-61%)	88,80 ± 4,92** (-20%)

Tabla 11. Efecto del deltametrín sobre el incremento de peso corporal y el consumo de alimento tras administración oral de 5 y 10 mg/kg p.c./día durante 5 días, datos correspondientes al estudio del efecto del deltametrín sobre los aminoácidos neurotransmisores en el SNC de la rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: **P < 0,01 y ***P < 0,001.

GRUPO	Incremento de peso (g)	Total alimento ingerido (g)
Grupo Control	26,40 ± 0,87	102,80 ± 1,66
Grupo I 5 mg/kg p.c.	7,40 ± 1,94*** (-72%)	67,60 ± 3,20*** (-34%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	8,20 ± 2,42*** (-69%)	72,00 ± 1,76*** (-29%)

Tabla 12. Efecto del deltametrín sobre el incremento de peso corporal y el consumo de alimento tras administración oral de 5 y 10 mg/kg p.c./día durante 5 días, datos correspondientes al estudio del efecto del deltametrín sobre las aminos biógenas en el SNC de la rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: ***P < 0,001.

5.1. EFECTOS DEL DELTAMETRÍN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS NEUROTRANSMISORES EN SNC

Corteza frontal

En los animales tratados oralmente con la dosis de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, se produjo un descenso estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (-12,54%) y glutamato (-20,68%) en la corteza frontal (Tabla 13).

También se observó un descenso estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (-12,87%), glutamato (-21,82%), glutamina (-10,28%), taurina (-28,84%) y GABA (-19,36%) en los animales tratados con la dosis oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 13).

RESULTADOS

	CORTEZA FRONTAL				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	7603,35 ± 228,20	26434,45 ± 911,51	2415,05 ± 38,81	7020,03 ± 397,89	3216,70 ± 61,79
Grupo I 5 mg/kg p.c.	6649,67 ± 93,99* (-12,54%)	20966,58 ± 1993,87* (-20,68%)	2287,40 ± 78,81	6244,98 ± 666,94	3434,52 ± 130,45
Grupo II 10 mg/kg p.c.	6624,54 ± 291,07* (-12,87%)	20665,45 ± 1406,87* (-21,82%)	2166,70 ± 61,26* (-10,28%)	4995,19 ± 205,09* (-28,84%)	2594,00 ± 78,36** (-19,36%)

Tabla 13. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en la corteza frontal de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05 y **P < 0,01.

Hipocampo

El tratamiento oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, indujo un aumento estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (28,10%), glutamato (12,84%) y glutamina (35,86%) en el hipocampo. Las concentraciones del resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados no fueron significativamente afectadas (Tabla 14).

	HIPOCAMPO				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	4730,99 ± 416,81	19018,77 ± 1009,71	2069,35 ± 178,89	4785,33 ± 334,45	3048,54 ± 118,13
Grupo I 5 mg/kg p.c.	4879,00 ± 326,80	17307,01 ± 491,56	1955,37 ± 120,49	5333,32 ± 324,99	3099,22 ± 219,74
Grupo II 10 mg/kg p.c.	6060,28 ± 183,28** (28,10%)	21461,15 ± 922,76** (12,84%)	2811,38 ± 45,42*** (35,86%)	6113,93 ± 411,63	3591,99 ± 112,27

Tabla 14. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en el hipocampo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: **P < 0,01 y *** P < 0,001.

Cuerpo estriado

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, indujo un descenso estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (-25,46% y -38,20%, respectivamente), glutamato (-29,77% y -36,39%, respectivamente), glutamina (-41,28% y -36,40%, respectivamente), taurina (-32,13% y -26,51%, respectivamente) y GABA (-22,81% y -22,35%, respectivamente) en el cuerpo estriado (Tabla 15).

	CUERPO ESTRIADO				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	10251,76 ± 595,38	35782,24 ± 2172,30	5930,69 ± 664,20	13879,65 ± 1046,18	5790,56 ± 94,64
Grupo I 5 mg/kg p.c.	7641,72 ± 207,34*** (-25,46%)	25129,89 ± 914,91*** (-29,77%)	3482,56 ± 207,23** (-41,28%)	9419,55 ± 296,68*** (-32,13%)	4469,68 ± 340,59** (-22,81%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	6335,65 ± 252,66*** (-38,20%)	22762,00 ± 962,44*** (-36,39%)	3771,65 ± 194,07** (-36,40%)	10200,52 ± 302,56*** (-26,51%)	4496,33 ± 225,95** (-22,35%)

Tabla 15. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en el cuerpo estriado de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: **P < 0,01 y ***P < 0,001.

Cerebelo

En los animales tratados oralmente con la dosis de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, se produjo un aumento (50,61%) estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (Tabla 16).

También se observó un aumento estadísticamente significativo de la concentración de aspartato (58,71%), glutamato (25,57%) y glutamina (24,27%) en los animales tratados con la dosis oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 16). Las concentraciones del resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados no fueron significativamente afectadas.

RESULTADOS

	CEREBELO				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	3506,86 ± 274,73	16504,80 ± 702,24	1442,68 ± 14,70	5317,06 ± 318,15	2605,72 ± 219,93
Grupo I 5 mg/kg p.c.	5281,75 ± 432,41** (50,61%)	16033,76 ± 921,39	1586,67 ± 94,65	4076,73 ± 498,71	2799,09 ± 224,99
Grupo II 10 mg/kg p.c.	5565,69 ± 336,59** (58,71%)	20724,93 ± 817,79** (25,57%)	1792,89 ± 39,68** (24,27%)	5340,77 ± 170,04	2893,81 ± 85,62

Tabla 16. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en el cerebelo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: **P < 0,01.

Hipotálamo

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, indujo un aumento (48,57% y 17,21%, respectivamente) estadísticamente significativo de la concentración de glutamina en el hipotálamo. Las concentraciones del resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados no fueron significativamente afectadas (Tabla 17).

	HIPOTÁLAMO				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	7791,58 ± 283,36	18729,92 ± 919,64	2879,62 ± 639,83	2930,02 ± 123,59	6717,38 ± 655,26
Grupo I 5 mg/kg p.c.	9407,46 ± 623,95	19917,94 ± 1482,26	4278,24 ± 262,55*** (48,57%)	3219,54 ± 318,64	8350,66 ± 575,88
Grupo II 10 mg/kg p.c.	8263,49 ± 422,21	19917,02 ± 1038,17	3375,08 ± 182,43* (17,21%)	3043,03 ± 106,36	7582,15 ± 261,89

Tabla 17. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en el hipotálamo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: * P < 0,05 y ***P < 0,001

Hipófisis

El tratamiento oral de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, indujo un aumento (33,24%) estadísticamente significativo de la concentración de glutamina en la hipófisis (Tabla 18). Las concentraciones del resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados no fueron significativamente afectadas.

	HIPÓFISIS				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	364,00 ± 16,59	604,80 ± 46,93	342,28 ± 31,47	381,17 ± 30,13	187,49 ± 4,38
Grupo I 5 mg/kg p.c.	386,45 ± 10,96	499,92 ± 36,61	456,05 ± 55,96* (33,24%)	303,70 ± 51,48	183,09 ± 6,11
Grupo II 10 mg/kg p.c.	346,65 ± 10,16	524,96 ± 11,54	314,04 ± 4,74	297,65 ± 13,26	167,80 ± 2,61

Tabla 18. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en la hipófisis de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05.

Mesencéfalo

Las concentraciones de los aminoácidos neurotransmisores estudiados no fueron significativamente afectadas en el mesencéfalo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 19).

RESULTADOS

	MESENCÉFALO				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	7212,08 ± 461,54	16969,57 ± 1213,36	1686,47 ± 183,21	2702,55 ± 319,70	5094,03 ± 251,32
Grupo I 5 mg/kg p.c.	7136,71 ± 668,50	15592,62 ± 1120,58	1688,60 ± 135,60	2819,68 ± 136,90	5833,05 ± 496,32
Grupo II 10 mg/kg p.c.	8204,16 ± 879,40	18949,52 ± 1550,25	2041,97 ± 254,16	3589,81 ± 349,93	6846,11 ± 584,92

Tabla 19. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en el mesencéfalo de rata. Valor medio ± ESM (n=5).

Bulbo raquídeo

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, indujo un descenso (-31,21% y -36,99%, respectivamente) estadísticamente significativo de la concentración de glutamina en el bulbo raquídeo (Tabla 20). Las concentraciones del resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados no fueron significativamente afectadas.

	BULBO RAQUÍDEO				
	Aspartato (ng/g)	Glutamato (ng/g)	Glutamina (ng/g)	Taurina (ng/g)	GABA (ng/g)
Grupo Control	6803,90 ± 431,03	12473,53 ± 894,67	2083,35 ± 152,82	1735,03 ± 199,50	2302,28 ± 116,90
Grupo I 5 mg/kg p.c.	6232,29 ± 389,10	12095,31 ± 792,85	1433,07 ± 104,28** (-31,21%)	1859,06 ± 92,12	2630,35 ± 135,56
Grupo II 10 mg/kg p.c.	6866,40 ± 371,91	13145,47 ± 739,15	1312,81 ± 93,41** (-36,99%)	1805,59 ± 144,52	2588,79 ± 194,30

Tabla 20. Efecto del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores en el bulbo raquídeo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: **P < 0,01.

5.2. EFECTOS DEL DELTAMETRÍN SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE AMINAS BIÓGENAS EN SNC

Corteza frontal

En los animales tratados oralmente con la dosis de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, se produjo un descenso (-37,82%) estadísticamente significativo de la concentración de serotonina, junto con un aumento (52,77%) estadísticamente significativo de su tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en la corteza frontal. También se observó un descenso estadísticamente significativo de la concentración de la serotonina (-33,29%) y de su metabolito 5-HIAA (-18,53%), junto con un aumento estadísticamente significativo de su tasa de recambio (20,37%) tras administración oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 21).

Las concentraciones de dopamina, de sus metabolitos DOPAC y HVA, y su tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) no fueron significativamente afectadas en la corteza frontal tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 22).

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un aumento (92,83% y 98,97%, respectivamente) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en la corteza frontal (Tabla 22).

	CORTEZA FRONTAL		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	445,50 ± 51,01	260,11 ± 11,31	0,62 ± 0,07
Grupo I 5 mg/kg p.c.	277,02 ± 35,64* (-37,82%)	278,65 ± 18,43	0,93 ± 0,03** (52,77%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	297,20 ± 16,41* (-33,29%)	211,90 ± 8,45* (-18,53%)	0,73 ± 0,05* (20,37%)

Tabla 21. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en la corteza frontal de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05 y **P < 0,01.

	CORTEZA FRONTAL				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	428,00 ± 65,86	333,28 ± 59,33	93,30 ± 14,12	91,67 ± 32,07	0,54 ± 0,07
Grupo I 5 mg/kg p.c.	825,33 ± 105,06* (92,83%)	1586,74 ± 658,11	372,89 ± 144,32	283,24 ± 90,89	0,50 ± 0,10
Grupo II 10 mg/kg p.c.	851,61 ± 129,07* (98,97%)	551,84 ± 102,14	234,90 ± 52,13	166,62 ± 18,64	0,79 ± 0,12

Tabla 22. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en la corteza frontal de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05.

Hipocampo

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de serotonina ni de su metabolito 5-HIAA en el hipocampo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Tampoco se observó un efecto significativo sobre la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) a las dosis de deltametrín estudiadas (Tabla 23).

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un descenso estadísticamente significativo del metabolito HVA (-65,94% y -45,27%,

respectivamente) y de la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) (-79,14% y -71,71%, respectivamente) en el hipocampo (Tabla 24).

También se observó un aumento (42,02% y 189,92%) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en el hipocampo en los animales tratados con las dosis orales de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 24).

	HIPOCAMPO		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	229,19 ± 6,74	223,40 ± 51,94	1 ± 0,25
Grupo I 5 mg/kg p.c.	163,25 ± 21,54	189,05 ± 34,44	1,13 ± 0,16
Grupo II 10 mg/kg p.c.	261,34 ± 13,45	277,67 ± 21,38	1,02 ± 0,12

Tabla 23. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo de rata. Valor medio ± ESM (n=5).

	HIPOCAMPO				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	537,86 ± 36,89	54,39 ± 7,36	37,44 ± 6,60	81,91 ± 16,88	2,35 ± 0,46
Grupo I 5 mg/kg p.c.	763,90 ± 42,18* (42,02%)	184,07 ± 17,49	60,56 ± 4,33	27,90 ± 4,44** (-65,94%)	0,49 ± 0,05*** (-79,14%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	1559,36 ± 386,78* (189,92%)	183,97 ± 15,83	74,94 ± 3,31	44,83 ± 4,37** (-45,27%)	0,67 ± 0,05*** (-71,71%)

Tabla 24. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en el hipocampo de rata. Valor medio ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P≤0,05, **P≤0,01 y ***P≤0,001.

Cuerpo estriado

En los animales tratados oralmente con la dosis de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, se produjo un descenso estadísticamente significativo de serotonina (-

22,52% y -26,86%, respectivamente) y de su metabolito 5-HIAA (-23,79% y -29,60%, respectivamente) en el cuerpo estriado (Tabla 25).

El tratamiento oral de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un descenso estadísticamente significativo de la concentración de dopamina (-27,95%) y de su metabolito DOPAC (-7,06%) en el cuerpo estriado, junto con un aumento (48,56%) estadísticamente significativo de la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) (Tabla 26).

También se observó un descenso estadísticamente significativo de la concentración de dopamina (-26,71%) y de su metabolito HVA (-10,90%) en el cuerpo estriado, junto con un aumento (25,33%) estadísticamente significativo de la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) en los animales tratados con la dosis oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día (Tabla 26).

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un aumento (49,02% y 115,27%) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en el cuerpo estriado (Tabla 26).

	CUERPO ESTRIADO		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	340,87 ± 17,04	257,71 ± 10,58	0,76 ± 0,02
Grupo I 5 mg/kg p.c.	264,10 ± 12,31* (-22,52%)	196,41 ± 5,71** (-23,79%)	0,75 ± 0,03
Grupo II 10 mg/kg p.c.	249,33 ± 18,03** (-26,86%)	181,41 ± 18,59** (-29,60%)	0,76 ± 0,12

Tabla 25. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el cuerpo estriado de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01.

	CUERPO ESTRIADO				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	756,53 ± 47,94	16047,01 ± 400,41	2828,17 ± 21,65	1985,77 ± 55,37	0,30 ± 0,01
Grupo I 5 mg/kg p.c.	1127,41 ± 96,74* (49,02)	11561,19 ± 386,05* (-27,95%)	2628,41 ± 30,20* (-7,06%)	1982,33 ± 73,47	0,45 ± 0,07* (48,56%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	1628,57 ± 273,96* (115,27%)	11761,19 ± 448,07*** (-26,71%)	2867,09,09 ± 559,88	1769,31 ± 45,88* (-10,90%)	0,38 ± 0,02** (25,33%)

Tabla 26. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en el cuerpo estriado de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

Cerebelo

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de serotonina ni de su metabolito 5-HIAA en el cerebelo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Tampoco se observó un efecto significativo sobre la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) a las dosis de deltametrín estudiadas (Tabla 27).

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de dopamina ni de sus metabolitos DOPAC y HVA en el cerebelo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Tampoco se observó un efecto significativo sobre la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) a las dosis de deltametrín estudiadas (Tabla 28).

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, indujo un aumento (94,55% y 166,62%) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en el cerebelo tras la dosis de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día, respectivamente (Tabla 28).

RESULTADOS

	CEREBELO		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	81,27 ± 9,02	56,78 ± 3,50	0,72 ± 0,06
Grupo I 5 mg/kg p.c.	73,08 ± 7,03	61,94 ± 3,23	0,87 ± 0,05
Grupo II 10 mg/kg p.c.	83,06 ± 18,85	60,19 ± 12,81	0,74 ± 0,04

Tabla 27. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el cerebelo de rata. Valor medio ± ESM (n=5).

	CEREBELO				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	784,43 ± 142,30	77,01 ± 15,22	34,32 ± 2,11	8,59 ± 0,66	0,62 ± 0,09
Grupo I 5 mg/kg p.c.	1526,10 ± 250,69* (94,55%)	167,88 ± 175,26	489,49 ± 67,34	13,54 ± 2,2	4,56 ± 1,01
Grupo II 10 mg/kg p.c.	2091,49 ± 271,57** (166,62%)	180,08 ± 44,16	394,77 ± 141,26	63,09 ± 30,62	2,11 ± 0,56

Tabla 28. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en el cerebelo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05 y **P < 0,01.

Hipotálamo

En los animales tratados oralmente con la dosis de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días, se produjo una disminución (-17,96%) estadísticamente significativa de la concentración de serotonina, junto con un aumento (58,01%) estadísticamente significativo de la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) en el hipotálamo. La dosis oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días también indujo un descenso (-10,49%) estadísticamente significativo de la concentración de serotonina, junto con un aumento (43,30%) estadísticamente significativo de la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) (Tabla 29).

RESULTADOS

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de dopamina ni de sus metabolitos DOPAC y HVA en el hipotálamo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Tampoco se observó un efecto significativo sobre la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) a las dosis de deltametrín estudiadas (Tabla 30).

El tratamiento oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un aumento (38,90%) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en el hipotálamo (Tabla 30).

HIPOTÁLAMO			
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	1847,95 ± 18,03	1199,93 ± 121,60	0,65 ± 0,06
Grupo I 5 mg/kg p.c.	1516,11 ± 70,10*** (-17,96%)	1542,31 ± 190,71	1,03 ± 0,13* (58,01%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	1654,06 ± 42,26* (-10,49%)	1539,52 ± 135,06	0,93 ± 0,02** (43,30%)

Tabla 29. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el hipotálamo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

HIPOTÁLAMO					
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	2566,50 ± 298,15	851,84 ± 153,02	146,99 ± 26,29	50,78 ± 12,72	0,27 ± 0,07
Grupo I 5 mg/kg p.c.	2937,25 ± 229,83	989,29 ± 113,97	228,46 ± 35,16	106,95 ± 11,57	0,34 ± 0,03
Grupo II 10 mg/kg p.c.	3564,77 ± 274,71* (38,90%)	1440 ± 171,41	252,89 ± 38,62	107,78 ± 23,87	0,23 ± 0,04

Tabla 30. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en el hipotálamo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05.

Hipófisis

El tratamiento oral de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un descenso (-26,75%) estadísticamente significativo de la concentración de serotonina en la hipófisis, junto con un aumento estadísticamente significativo de la concentración de su metabolito 5-HIAA (88,41%) y de la tasa de recambio serotoninérgica (5-HIAA/5-HT) (169,78%) (Tabla 31).

El tratamiento oral de 5 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un descenso estadísticamente significativo de la concentración de dopamina (-7,30%), de su metabolito HVA (-57,82%) y de la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) (-43,34%) en el cuerpo estriado (Tabla 32). También se observó un descenso estadísticamente significativo de la concentración del metabolito HVA (-70,57%) y de la tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) (-61,58%) en los animales tratados con la dosis oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día (Tabla 32).

El tratamiento oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un aumento (32,01%) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en la hipófisis (Tabla 32).

	HIPÓFISIS		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	659,90 ± 45,23	116,25 ± 4,89	0,18 ± 0,02
Grupo I 5 mg/kg p.c.	483,34 ± 41,28* (-26,75)	219,02 ± 30,59** (88,41%)	0,49 ± 0,11** (169,78%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	885,14 ± 82,15	125,48 ± 16,76	0,14 ± 0,02

Tabla 31. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en la hipófisis de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05 y **P < 0,01.

	HIPÓFISIS				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	581,17 ± 75,73	165,91 ± 16,54	37,14 ± 3,77	293,52 ± 12,41	2,07 ± 0,23
Grupo I 5 mg/kg p.c.	735,66 ± 45,08	153,80 ± 10,74* (-7,30%)	55,71 ± 2,93	123,81 ± 18,04*** (-57,82%)	1,17 ± 0,12** (-43,34%)
Grupo II 10 mg/kg p.c.	767,21 ± 61,58* (32,01%)	209,13 ± 46,87	47,79 ± 9,92	86,40 ± 16,54*** (-70,57%)	0,80 ± 0,19** (-61,58%)

Tabla 32. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en la hipófisis de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

Mesencéfalo

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de serotonina ni de su metabolito 5-HIAA en el mesencéfalo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Tampoco se observó un efecto significativo sobre la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) a las dosis de deltametrín estudiadas (Tabla 33).

El tratamiento oral de 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un descenso estadísticamente significativo de la concentración de dopamina (-40,87%) y de su metabolito DOPAC (-21,53%) en el mesencéfalo (Tabla 34).

RESULTADOS

También se observó un aumento (55,63%) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en el mesencéfalo tras la administración oral de la dosis de 10 mg deltametrín/kg p.c./día (Tabla 34).

	MESENCÉFALO		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	1163,19 ± 115,31	607,36 ± 171,38	0,50 ± 0,10
Grupo I 5 mg/kg p.c.	890,33 ± 146,35	560,17 ± 85,25	0,64 ± 0,04
Grupo II 10 mg/kg p.c.	2216,86 ± 509,70	1337,65 ± 340,60	0,65 ± 0,11

Tabla 33. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el mesencéfalo de rata. Valor medio ± ESM (n=5).

	MESENCÉFALO				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	1188,42 ± 131,08	1804,55 ± 169,77	191,96 ± 9,73	166,12 ± 19,74	0,20 ± 0,01
Grupo I 5 mg/kg p.c.	1401,41 ± 108,46	1764,23 ± 68,20	187,33 ± 7,76	146,36 ± 13,06	0,19 ± 0,01
Grupo II 10 mg/kg p.c.	1849,56 ± 188,58* (55,63%)	1067,11 ± 65,59** (-40,87%)	150,62 ± 7,24** (-21,53%)	100,88 ± 1,86	0,24 ± 0,02

Tabla 34. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DA, DOPAC y HVA en el mesencéfalo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01.

Bulbo raquídeo

No se observaron variaciones estadísticamente significativas en las concentraciones de serotonina ni de su metabolito 5-HIAA en el bulbo raquídeo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días. Tampoco se observó un efecto significativo sobre la tasa de recambio (5-HIAA/5-HT) a las dosis de deltametrín estudiadas (Tabla 35).

RESULTADOS

Las concentraciones de dopamina, de sus metabolitos DOPAC y HVA, y su tasa de recambio ((DOPAC+HVA)/DA) no fueron significativamente afectadas en el bulbo raquídeo tras administración oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días (Tabla 36).

El tratamiento oral de 5 mg y 10 mg deltametrín/kg p.c./día durante 5 días indujo un aumento (48,95% y 50,01%, respectivamente) estadísticamente significativo de la concentración de noradrenalina en el bulbo raquídeo (Tabla 36).

	BULBO RAQUÍDEO		
	5-HT (ng/g)	5-HIAA (ng/g)	5-HIAA/5-HT (ng/g)
Grupo Control	1382,43 ± 89,10	710,81 ± 62,70	0,51 ± 0,02
Grupo I 5 mg/kg p.c.	1610,42 ± 138,90	925,71 ± 96,89	0,58 ± 0,04
Grupo II 10 mg/kg p.c.	1284,77 ± 135,70	780,30 ± 80,20	0,61 ± 0,02

Tabla 35. Efecto del deltametrín sobre el contenido de 5-HT y 5-HIAA en el bulbo raquídeo de rata. Valor medio ± ESM (n=5).

	BULBO RAQUÍDEO				
	NA (ng/g)	DA (ng/g)	DOPAC (ng/g)	HVA (ng/g)	(DOPAC+HVA)/DA (ng/g)
Grupo Control	735,56 ± 96,77	537,95 ± 43,26	59,09 ± 2,03	43,20 ± 4,49	0,19 ± 0,01
Grupo I 5 mg/kg p.c.	1095,59 ± 46,18** (48,95%)	717,27 ± 64,10	77,71 ± 8,79	58,94 ± 15,54	0,19 ± 0,02
Grupo II 10 mg/kg p.c.	1103,44 ± 56,02** (50,01%)	700,70 ± 68,19	79,29 ± 8,67	32,30 ± 3,04	0,17 ± 0,02

Tabla 36. Efecto del deltametrín sobre el contenido de NA, DOPAC, DA y HVA en el bulbo raquídeo de rata. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: **P < 0,01.

En las tablas 37, 38, 39 y 40 se resumen los efectos del deltametrín sobre el contenido de aminoácidos neurotransmisores y aminas biógenas en SNC de rata.

Concentración (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Cerebelo	Hipotálamo	Hipófisis	Mesencéfalo	Blbo raquídeo
Grupo Control								
Aspartato	7603,35 ± 228,20	4730,99 ± 416,81	10251,76 ± 595,38	3506,86 ± 274,73	7791,58 ± 283,36	364,00 ± 16,59	7212,08 ± 461,54	6803,90 ± 431,03
Glutamato	26434,45 ± 911,51	19018,77 ± 1009,71	35782,24 ± 2172,30	16504,80 ± 702,24	18729,92 ± 919,64	604,80 ± 46,93	16969,57 ± 1213,36	12473,53 ± 894,67
Glutamina	2415,05 ± 38,81	2069,35 ± 178,89	5930,69 ± 664,20	1442,68 ± 14,70	2879,62 ± 639,83	342,28 ± 31,47	1686,47 ± 183,21	2083,35 ± 152,82
Taurina	7020,03 ± 397,89	4785,33 ± 334,45	13879,65 ± 1046,18	5317,06 ± 318,15	2930,02 ± 123,59	381,17 ± 30,13	2702,55 ± 319,70	1735,03 ± 199,50
GABA	3216,70 ± 61,79	3048,54 ± 118,13	5790,56 ± 94,64	2605,72 ± 219,93	6717,38 ± 655,26	187,49 ± 4,38	5094,03 ± 251,32	2302,28 ± 116,90
Grupo I – 5mg/kg p.c.								
Aspartato	6649,67 ± 93,99* (-12,54%)	4879,00 ± 326,80	7641,72 ± 207,34*** (-25,46%)	5281,75 ± 432,41** (50,61%)	9407,46 ± 623,95	386,45 ± 10,96	7136,71 ± 668,50	6232,29 ± 389,10
Glutamato	20966,58 ± 1993,87* (-20,68%)	17307,01 ± 491,56	25129,89 ± 914,91*** (-29,77%)	16033,76 ± 921,39	19917,94 ± 1482,26	499,92 ± 36,61	15592,62 ± 1120,58	12095,31 ± 792,85
Glutamina	2287,40 ± 78,81	1955,37 ± 120,49	3482,56 ± 207,23** (-41,28%)	1586,67 ± 94,65	4278,24 ± 262,55*** (48,57%)	456,05 ± 55,96* (33,24%)	1688,60 ± 135,60	1433,07 ± 104,28** (-31,21%)
Taurina	6244,98 ± 666,94	5333,32 ± 324,99	9419,55 ± 296,68*** (-32,13%)	4076,73 ± 498,71	3219,54 ± 318,64	303,70 ± 51,48	2819,68 ± 136,90	1859,06 ± 92,12
GABA	3434,52 ± 130,45	3099,22 ± 219,74	4469,68 ± 340,59** (-22,81%)	2799,09 ± 224,99	8350,66 ± 575,88	183,09 ± 6,11	5833,05 ± 496,32	2630,35 ± 135,56
Grupo II - 10 mg/kg p.c.								
Aspartato	6624,54 ± 291,07* (-12,87%)	6060,28 ± 183,28** (28,10%)	6335,65 ± 252,66*** (-38,20%)	5565,69 ± 336,59** (58,71%)	8263,49 ± 422,21	346,65 ± 10,16	8204,16 ± 879,40	6866,40 ± 371,91
Glutamato	20665,45 ± 1406,87* (-21,82%)	21461,15 ± 922,76** (12,84%)	22762,00 ± 962,44*** (-36,39%)	20724,93 ± 817,79** (25,57%)	19917,02 ± 1038,17	524,96 ± 11,54	18949,52 ± 1550,25	13145,47 ± 739,15
Glutamina	2166,70 ± 61,26* (-10,28%)	2811,38 ± 45,42*** (35,86%)	3771,65 ± 194,07** (-36,40%)	1792,89 ± 39,68** (24,27%)	3375,08 ± 182,43* (17,21%)	314,04 ± 4,74	2041,97 ± 254,16	1312,81 ± 93,41** (-36,99%)
Taurina	4995,19 ± 205,09* (-28,84%)	6113,93 ± 411,63	10200,52 ± 302,56*** (-26,51%)	5340,77 ± 170,04	3043,03 ± 106,36	297,65 ± 13,26	3589,81 ± 349,93	1805,59 ± 144,52
GABA	2594,00 ± 78,36** (-19,36%)	3591,99 ± 112,27	4496,33 ± 225,95** (-22,35%)	2893,81 ± 85,62	7582,15 ± 261,89	167,80 ± 2,61	6846,11 ± 584,92	2588,79 ± 194,30

Tabla 37. Efecto del deltametrín sobre la concentración de aminoácidos neurotransmisores aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA tras administración oral de 5 mg y 10 mg/kg p.c. /día durante 5 días en SNC. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

Concentración (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Cerebelo	Hipotálamo	Hipófisis	Mesencéfalo	Bulbo raquídeo
Grupo Control								
5-HT	445,50 ± 51,01	229,19 ± 6,74	340,87 ± 17,04	81,27 ± 9,02	1847,95 ± 18,03	659,90 ± 45,23	1163,19 ± 115,31	1382,43 ± 89,10
5-HIAA	260,11 ± 11,31	223,40 ± 51,94	257,71 ± 10,58	56,78 ± 3,50	1199,93 ± 121,60	116,25 ± 4,89	607,36 ± 171,38	710,81 ± 62,70
5-HIAA/5-HT	0,62 ± 0,07	1 ± 0,25	0,76 ± 0,02	0,72 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,50 ± 0,10	0,51 ± 0,02
Grupo I – 5mg/kg p.c.								
5-HT	277,02 ± 35,64* (-37,82%)	163,25 ± 21,54	264,10 ± 12,31* (-22,52%)	73,08 ± 7,03	1516,11 ± 70,10*** (-17,96%)	483,34 ± 41,28* (-26,75%)	890,33 ± 146,35	1610,42 ± 138,90
5-HIAA	278,65 ± 18,43	189,05 ± 34,44	196,41 ± 5,71** (-23,79%)	61,94 ± 3,23	1542,31 ± 190,71	219,02 ± 30,59** (88,41%)	560,17 ± 85,25	925,71 ± 96,89
5-HIAA/5-HT	0,93 ± 0,03** (52,77%)	1,13 ± 0,16	0,75 ± 0,03	0,87 ± 0,05	1,03 ± 0,13* (58,01%)	0,49 ± 0,11** (169,78%)	0,64 ± 0,04	0,58 ± 0,04
Grupo II - 10 mg/kg p.c.								
5-HT	297,20 ± 16,41* (-33,29%)	261,34 ± 13,45	249,33 ± 18,03** (-26,86%)	83,06 ± 18,85	1654,06 ± 42,26* (-10,49%)	885,14 ± 82,15	2216,86 ± 509,70	1284,77 ± 135,70
5-HIAA	211,90 ± 8,45* (-18,53%)	277,67 ± 21,38	181,41 ± 18,59** (-29,60%)	60,19 ± 12,81	1539,52 ± 135,06	125,48 ± 16,76	1337,65 ± 340,60	780,30 ± 80,20
5-HIAA/5-HT	0,73 ± 0,05* (20,37%)	1,02 ± 0,12	0,76 ± 0,12	0,74 ± 0,04	0,93 ± 0,02** (43,3%)	0,14 ± 0,02	0,65 ± 0,11	0,61 ± 0,02

Tabla 38. Efecto del deltametrín sobre la concentración de 5-HT y 5-HIAA tras administración oral de 5 mg y 10 mg/kg p.c. /día durante 5 días en SNC. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

Concentración (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Cerebelo	Hipotálamo	Hipófisis	Mesencéfalo	Bulbo raquídeo
Grupo Control								
DA	333,28 ± 59,33	54,39 ± 7,36	16047,01 ± 400,41	77,01 ± 15,22	851,84 ± 153,02	165,91 ± 16,54	1804,55 ± 169,77	537,95 ± 43,26
DOPAC	93,30 ± 14,12	37,44 ± 6,60	2828,17 ± 21,65	34,32 ± 2,11	146,99 ± 26,29	37,14 ± 3,77	191,96 ± 9,73	59,09 ± 2,03
HVA	91,67 ± 32,07	81,91 ± 16,88	1985,77 ± 55,37	8,59 ± 0,66	50,78 ± 12,72	293,52 ± 12,41	166,12 ± 19,74	43,20 ± 4,49
(DOPAC+HVA)/DA	0,54 ± 0,07	2,35 ± 0,46	0,30 ± 0,01	0,62 ± 0,09	0,27 ± 0,07	2,07 ± 0,23	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Grupo I – 5mg/kg p.c.								
DA	1586,74 ± 658,11	184,07 ± 17,49	11561,19 ± 386,05* (-27,95%)	167,88 ± 175,26	989,29 ± 113,97	153,80 ± 10,74* (-7,30%)	1764,23 ± 68,20	717,27 ± 64,10
DOPAC	372,89 ± 144,32	60,56 ± 4,33	2628,41 ± 30,20* (-7,06%)	489,49 ± 67,34	228,46 ± 35,16	55,71 ± 2,93	187,33 ± 7,76	77,71 ± 8,79
HVA	283,24 ± 90,89	27,90 ± 4,44** (-65,94%)	1982,33 ± 73,47	13,54 ± 2,2	106,95 ± 11,57	123,81 ± 18,04*** (-57,82%)	146,36 ± 13,06	58,94 ± 15,54
(DOPAC+HVA)/DA	0,50 ± 0,10	0,49 ± 0,05*** (-79,14%)	0,45 ± 0,07* (48,56%)	4,56 ± 1,01	0,34 ± 0,03	1,17 ± 0,12** (-43,34%)	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,02
Grupo II – 10 mg/kg p.c.								
DA	551,84 ± 102,14	183,97 ± 15,83	11761,19 ± 448,07*** (-26,71%)	180,08 ± 44,16	1440 ± 171,41	209,13 ± 46,87	1067,11 ± 65,59** (-40,87%)	700,70 ± 68,19
DOPAC	234,90 ± 52,13	74,94 ± 3,31	2867,09 ± 559,88	394,77 ± 141,26	252,89 ± 38,62	47,79 ± 9,92	150,62 ± 7,24** (-21,53%)	79,29 ± 8,67
HVA	166,62 ± 18,64	44,83 ± 4,37** (-45,27%)	1769,31 ± 45,88* (-10,90%)	63,09 ± 30,62	107,78 ± 23,87	86,40 ± 16,54*** (-70,57%)	100,88 ± 1,86	32,30 ± 3,04
(DOPAC+HVA)/DA	0,79 ± 0,12	0,67 ± 0,05*** (-71,71%)	0,38 ± 0,02** (25,33%)	2,11 ± 0,56	0,23 ± 0,04	0,80 ± 0,19** (-61,58%)	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,02

Tabla 39. Efecto del deltametrín sobre la concentración de DA, DOPAC y HVA tras administración oral de 5 mg y 10 mg/kg p.c. /día durante 5 días en SNC. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05, **P < 0,01 y ***P < 0,001.

Concentración (ng/g)	Corteza frontal	Hipocampo	Cuerpo estriado	Cerebelo	Hipotálamo	Hipófisis	Mesencéfalo	Bulbo raquídeo
Grupo Control								
NA	428,00 ± 65,86	537,86 ± 36,89	756,53 ± 47,94	784,43 ± 142,30	2566,50 ± 298,15	581,17 ± 75,73	1188,42 ± 131,08	735,56 ± 96,77
Grupo I – 5mg/kg p.c.								
NA	825,33 ± 105,06* (92,83%)	763,90 ± 42,18* (42,02%)	1127,41 ± 96,74* (49,02%)	1526,10 ± 250,69* (94,55%)	2937,25 ± 229,83	735,66 ± 45,08	1401,41 ± 108,46	1095,59 ± 46,18** (48,95%)
Grupo II - 10 mg/kg p.c.								
NA	851,61 ± 129,07* (98,97%)	1559,36 ± 386,78* (189,92%)	1628,57 ± 273,96* (115,27%)	2091,49 ± 271,57** (166,62%)	3564,77 ± 274,71* (38,90%)	767,21 ± 61,58* (32,01%)	1849,56 ± 188,58* (55,63%)	1103,44 ± 56,02** (50,01%)

Tabla 40. Efecto del deltametrin sobre la concentración de NA tras administración oral de 5 mg y 10 mg/kg p.c. /día durante 5 días en SNC. Valor medio ± ESM (n=5). Entre paréntesis se indica la diferencia en porcentaje con respecto al grupo control. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control: *P < 0,05 y **P < 0,01.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El deltametrín es un insecticida piretroide sintético Tipo II utilizado con éxito para controlar plagas en muchos tipos de cultivos como algodón, café, maíz, cereales, mango, tomate, etc. También se ha empleado para el control de vectores en salud animal y salud pública, incorporándose incluso en aerosoles y sprays de uso doméstico para el control de moscas, mosquitos y cucarachas. Aunque se ha venido considerando un insecticida relativamente seguro, últimamente se sabe que es neurotóxico en mamíferos (Aldridge *et al.*, 1978; Bloom *et al.*, 1983; Brodie y Aldridge, 1982; Cremer *et al.*, 1983, Brodie y Opacka, 1987; Crofton y Reiter, 1984, 1988ab; Glowa, 1986; Stein *et al.*, 1987, Husain *et al.*, 1996; Wolanski *et al.*, 2006; Wolanski y Harrill, 2008; EFSA, 2009), produciendo a dosis agudas en roedores el *Síndrome neurológico CS*, que se caracteriza por salivación, tremor y convulsiones (Barnes y Verschoyle, 1974).

El presente estudio presenta los efectos del deltametrín sobre los niveles de aminoácidos neurotransmisores y de catecolaminas en el SNC de ratas macho Wistar expuestas oralmente al insecticida a las dosis de 5 y 10 mg/kg p.c./día durante cinco días, investigación que a nuestro conocimiento no ha sido descrita en la literatura científica. El presente trabajo pretende obtener mayor información sobre los mecanismos de neurotoxicidad de los piretroides Tipo II, como el deltametrín. Se han estudiado los efectos sobre las concentraciones de aminoácidos neurotransmisores y aminas biógenas en el SNC, en concreto en las regiones cerebrales hipófisis, hipotálamo, cerebelo, bulbo raquídeo, corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado y mesencéfalo.

En nuestro trabajo, se observó una disminución estadísticamente significativa del consumo de alimento y la ganancia de peso corporal en todos los grupos de animales tratados oralmente con deltametrín (Tabla 11 y Tabla 12), tanto a la dosis de 5 mg/kg p.c. como a la dosis de 10 mg/kg p.c. lo que coincide con varios estudios realizados en ratas tanto con otros piretroides (Hijzen *et al.*, 1988), como con el propio deltametrín (Abdel-Khalik *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2013; Saillenfait *et al.*, 2016). Se conoce que la noradrenalina está implicada en la regulación de la ingesta de alimento (Fox y Wightman, 2017) y al liberarse en las terminaciones estriatales puede influir en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, comprometiendo los centros del estrés cerebrales, suprimiendo la ingesta de alimentos e induciendo anorexia (Forray y Gysling, 2004), por lo que el aumento de los niveles de noradrenalina que observamos en el presente estudio en cuerpo estriado de los animales tratados con deltametrín a las dosis de 5 y 10 mg/kg p.c. podría estar induciendo una reducción del consumo de alimento con la consiguiente pérdida de peso.

El locus coeruleus (LC), un pequeño núcleo localizado en la cara rostral del IV ventrículo, es la fuente principal de noradrenalina en el SNC y envía proyecciones a prácticamente todas sus regiones, siendo además la única fuente de noradrenalina para el cerebelo y el prosencéfalo (Feinstein *et al.*, 2016). Además de estar implicada en trastornos por estrés (Van Bockstaele y Valentino, 2013), en la regulación del comportamiento en los estados de alerta y atención (Benarroch, 2009; Berridge *et al.*, 2012), en la modulación del aprendizaje y la memoria (Uematsu *et al.*, 2015) y en la regulación circadiana del estado de vigilia (Aston-Jones, 2005), la noradrenalina tiene otras funciones en el SNC que incluyen restringir el desarrollo de la activación neuroinflamatoria y facilitar neuroprotección frente al estrés oxidativo (Feinstein *et al.*,

2016). Desde hace unos años, se está evidenciando que la disrupción de los niveles fisiológicos de noradrenalina contribuye al desarrollo de insomnio, narcolepsia, trastornos de estrés post-traumático, depresión, ansiedad, y a una variedad de enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer y la esclerosis múltiple, y en muchos casos, el daño de las neuronas noradrenérgicas del LC es el origen de esta desregulación (Feinstein *et al.*, 2016). Varios estudios *in vitro* confirman las acciones antiinflamatorias y neuroprotectoras de la noradrenalina. La noradrenalina compensa la neurotoxicidad provocada por estímulos inflamatorios (Madrigal *et al.*, 2005) y excitotóxicos (Madrigal *et al.*, 2007) y reduce el daño por estrés oxidativo en neurona primarias (Troade *et al.*, 2001) uniéndose y activando receptores adrenérgicos, uniéndose a receptores gliales que reducen la inflamación o aumentan la liberación de factores tróficos y reduciendo el estrés oxidativo recaptando radicales libres (Feinstein *et al.*, 2016). También disponemos de estudios *in vivo* que confirman que el aumento de los niveles de noradrenalina reduce la inflamación cerebral y el daño neuronal (Veryac *et al.*, 2005, Gustafson *et al.*, 1990, Martel *et al.*, 1998). Los antagonistas selectivos $\alpha 2$ -adrenérgicos incrementan los niveles de noradrenalina al bloquear los $\alpha 2$ -autorreceptores presinápticos que normalmente reducen la liberación de dicha catecolamina desde las neuronas del LC (Feinstein *et al.*, 2016). Los $\alpha 2$ -antagonistas tienen efectos neuromoduladores frente a excitotoxicidad en el estriado de ratas (Martel *et al.*, 1998), mejoran la recuperación funcional del neocórtex e hipocampo de ratas tras episodios de isquemia cerebral (Gustafson *et al.*, 1990), y mejoran la supervivencia neuronal en regiones cerebrales bajo neurogénesis del ratón adulto (Veryac *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, vemos un aumento estadísticamente significativo, dosis-dependiente, de los niveles de noradrenalina en las regiones cerebrales (por orden decreciente): hipocampo, cerebelo, cuerpo estriado, corteza frontal, mesencéfalo, bulbo

raquídeo, hipotálamo e hipófisis (Tabla 40). La compleja naturaleza de los efectos de los piretroides sobre el SNC ha dado lugar a varios autores a sugerir que provocan un aumento de la liberación de noradrenalina en paralelo a la entrada de calcio, indicando una acción vía canales de sodio o calcio voltaje-dependientes (Ray y Fry, 2006). Se ha visto que el deltametrín estimula la liberación de noradrenalina en sinaptosomas con una dosis-efectiva 50 (DE₅₀) de tan solo $2,9 \times 10^{-9}$ M (Brooks y Clark, 1987). Sabiendo que el deltametrín podría inducir neurodegeneración *in vivo* e *in vitro*, así como daño oxidativo y muerte celular por apoptosis en el cerebro (Varol *et al.*, 2016; Romero *et al.*, 2012), podemos sugerir que los incrementos observados en este trabajo en la concentración cerebral de noradrenalina se producirían en respuesta al efecto excitotóxico y al daño neuronal ejercido por el deltametrín en las distintas regiones cerebrales estudiadas.

La corteza cerebral forma un revestimiento completo del hemisferio cerebral compuesto por sustancia gris y constituye el nivel más alto del SNC (Snell, 2006). El córtex prefrontal (CPF) constituye aproximadamente el 30% de la corteza cerebral y se puede distinguir de otras áreas del lóbulo frontal por su composición celular, su innervación dopaminérgica o sus aferencias talámicas (Davidson *et al.*, 2000). Posee conexiones con los lóbulos parietales, temporales, regiones límbicas (especialmente el hipotálamo), ganglios basales (cuerpo estriado), hipocampo y cerebelo. Ha de considerarse por tanto como un área de asociación heteromodal interconectada con una red distribuida de regiones corticales y subcorticales (Tirapu-Ustárroz *et al.*, 2008). En el CPF destacan los circuitos dorsolateral, orbitofrontal y ventromedial. El circuito prefrontal dorsolateral participa principalmente en el control ejecutivo, memoria de trabajo, atención selectiva, formación de conceptos y flexibilidad cognitiva, el orbitofrontal

media en la conducta social y el ventromedial en el procesamiento de señales emocionales que guían nuestra toma de decisiones hacia objetivos adaptativos (Bechara *et al.*, 2000). Así, los déficits debidos a lesiones del CPF suelen conllevar alteraciones tanto cognitivas, como conductuales y emocionales.

Tras la administración de deltametrín, a la dosis más elevada (10 mg/kg p.c.), observamos un descenso estadísticamente significativo de los niveles de taurina en corteza frontal y en cuerpo estriado (Tabla 37), lo que podría causar un desequilibrio excitatorio/inhibitorio aminoacídico y el consiguiente daño neuronal. La taurina alcanza sus mayores concentraciones en corteza, cerebelo, estriado y núcleo supraóptico (Molchanova *et al.*, 2007). El cerebro neonatal contiene elevados niveles de taurina, pero a medida que el cerebro madura, su contenido en taurina se reduce hasta alcanzar concentraciones estables en la edad adulta, siendo el segundo aminoácido endógeno más abundante del SNC por detrás del glutamato (El Isidri *et al.*, 2013). Desempeña múltiples funciones, tales como la termo- y osmorregulación, la estabilización del plegamiento proteico, modulando efectos antiinflamatorios, antioxidantes e interviniendo en la homeostasis del calcio y desarrollo neuronal (Kim *et al.*, 2014). Además, es un neuromodulador inhibitorio aumentando la conductancia al Cl⁻ y provocando una hiperpolarización por su acción sobre los receptores de GABA y de glicina (Molchanova *et al.*, 2007), que contrarresta la despolarización neuronal asociada con excitotoxicidad (Paula-Lima *et al.*, 2013). Las concentraciones cerebrales de taurina aumentan significativamente bajo condiciones de estrés (Wu *et al.*, 1998) para contrarrestar los efectos excitotóxicos del glutamato, puesto que la taurina puede interactuar con los receptores NMDA, reduciendo las uniones del glutamato (Amorini *et al.*, 2017). Deficiencias en los niveles de taurina a nivel del SNC se asocian a lesiones

cerebrales severas (Seki *et al.*, 2005), y a patologías como la epilepsia (Perry y Hansen, 1981) y la enfermedad de Alzheimer (Csernansky *et al.*, 1996). Además, se sabe que la taurina es un agente protector frente al estrés oxidativo, pues bloquea la generación de radicales libres mediante la inhibición de los incrementos citoplasmáticos de calcio y previniendo por tanto la disfunción mitocondrial (Prentice *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha demostrado que el deltametrín induce neurodegeneración *in vivo* e *in vitro*, así como daño oxidativo y muerte celular por apoptosis en el cerebro (Varol *et al.*, 2016). Romero *et al.* (2012) demostraron que el estrés oxidativo es uno de los principales mecanismos inductores de neurotoxicidad del deltametrín, provocado por la liberación de radicales libres y peroxidación lipídica que inducen el compuesto padre y sus metabolitos 2'-OH-deltametrín y 4'-OH-deltametrín, y otros estudios han demostrado que piretroides como la cipermetrina, lamda-cihalotrín y betacliflutrín inducen estrés oxidativo (Giray *et al.*, 2001; El-Demerdash, 2007; El-Demerdash *et al.*, 2003; Sadowska-Woda *et al.*, 2010). A la vista de estos datos, y de los resultados de nuestro trabajo, podemos sugerir que el deltametrín provoca un descenso en las concentraciones de taurina en la corteza frontal y en cuerpo estriado que podría dificultar que ésta ejerza sus funciones neuromoduladoras, facilitando así el daño oxidativo y la degeneración neuronal por deltametrín.

Ensayos *in vitro*, han revelado que la taurina incrementa la supervivencia neuronal bajo condiciones de excitotoxicidad (Zhao *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2005), y por tanto se ha considerado útil en el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos, incluyendo isquemia, convulsiones epilépticas y estrés oxidativo (Molchanova *et al.*, 2007). Varios estudios recientes han demostrado los efectos terapéuticos de la taurina como potenciador cognitivo en modelos animales (Liu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014). La

suplementación exógena de taurina en ratas preñadas reduce la apoptosis en tejidos cerebrales de las ratas neonatales sometidas a restricción del crecimiento en el útero, debido al descenso en la expresión de la caspasa-3 en la corteza frontal (Liu *et al.*, 2013). La taurina suplementada a través del agua de bebida en ratones adultos APP/PS1 (modelo animal para la enfermedad de Alzheimer) mejoró su memoria, redujo la neuroinflamación y disminuyó la fracción insoluble del amiloide β ($A\beta$) en la corteza, que durante el desarrollo del Alzheimer se despliega en agregados tóxicos asociados a pérdida neuronal y daño sináptico (Kim *et al.*, 2014). A la vista de estos datos, el descenso significativo de los niveles de taurina en corteza frontal y en estriado por la exposición oral al deltametrín, podemos sugerir que la taurina podría servir como marcador para prevenir el daño neuronal por apoptosis; la suplementación con taurina podría reducir las consecuencias neurológicas derivadas de la intoxicación por deltametrín, si bien esta hipótesis requiere de más estudios a este nivel.

En nuestro trabajo, en corteza frontal, además de la disminución de los niveles de taurina, observamos una reducción de los niveles del resto de aminoácidos neurotransmisores estudiados (Tabla 37), lo que nos indicaría una puesta en marcha de los procesos de muerte neuronal dada la elevada toxicidad del deltametrín sobre las células corticales. El deltametrín induce muerte celular por apoptosis de forma dosis-dependiente en cultivos de neuronas corticales (Wu *et al.*, 2003). Diversos estudios *in vivo* confirman una reducción en el número de neuronas hipocámpales y corticales de ratas tras la administración de deltametrín (Wu y Liu, 2000; Ning-Ning Chen *et al.*, 2012).

En nuestro trabajo, también se evidenció que deltametrín origina una disminución significativa de los niveles de GABA en corteza frontal y en cuerpo estriado (Tabla 37). El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC y está presente en las neuronas de todas las regiones cerebrales (El Isidri *et al.*, 2013). Es liberado por las neuronas en respuesta a la excitotoxicidad del glutamato participando en los mecanismos de defensa neuronales para compensar la sobreactivación glutamatérgica (El Isidri *et al.*, 2013). El ratio o proporción de neuronas glutamatérgicas/gabaérgicas en el neocórtex es de aproximadamente 5:1, y la disrupción de este ratio puede presentarse en desórdenes neuronales (Lehmann *et al.*, 2012). El sistema GABAérgico tiene un importante papel en la formación y la consolidación de la memoria, y existen evidencias de que cambios en áreas GABAérgicas del cerebro originan cambios en la memoria (Dere *et al.*, 2007). En este sentido, se ha demostrado que la reducción del GABA en la corteza prefrontal causa un retraso en las actividades realizadas por monos (Michels *et al.*, 2012). También parece que el descenso en las funciones cognitivas durante el envejecimiento podría atribuirse, al menos en parte, a la reducción en la neurotransmisión inhibitoria del GABA, puesto que se han observado varios cambios en parámetros GABAérgicos en la corteza y el hipocampo de ratas viejas que sugieren disrupción del GABA (Marczynski, 1998). Asimismo, múltiples evidencias indican disrupción GABAérgica en la enfermedad de Alzheimer, con reducción de las concentraciones del GABA en corteza frontal, temporal y parietal (Lanctôt *et al.*, 2004). Por estas razones, la estimulación GABAérgica mediante agonistas endógenos del receptor GABA_A como la taurina podría representar una alternativa terapéutica en el Alzheimer (Paula-Lima *et al.*, 2013) y el envejecimiento (El Isidri *et al.*, 2013).

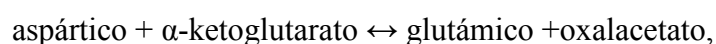
Se conoce que la administración intraperitoneal de deltametrín a dosis más elevadas que las usadas en nuestro estudio (20 mg/kg p.c./día durante 6 días) en ratas macho Wistar, indujo una disminución estadísticamente significativa de los niveles de 5-HIAA (Martínez-Larrañaga *et al.*, 2003). En el presente estudio, también se observó una disminución significativa de los niveles de 5-HT y de 5-HIAA (Tabla 38). Por otra parte, las interconexiones corticales serotoninérgicas-GABAérgicas participan en la regulación del estado anímico (Millan, 2003), y la disminución del contenido de GABA en corteza cerebral se ha relacionado con estados de ansiedad (Braestrup *et al.*, 1982). Estos hechos sugieren que el deltametrín podría inducir ansiedad mediante un descenso de la concentración cortical de serotonina y GABA, como ocurre en el presente trabajo.

Adhikari *et al.* (2010) evidenciaron que la corteza frontal y el hipocampo ventral están sincronizados para modular los comportamientos relacionados con la ansiedad en los ratones, además de estar anatómicamente relacionados, pues el área orbitofrontal del lóbulo frontal posee fuertes conexiones con el sistema límbico. El hipocampo o formación hipocámpica es una estructura en forma de C que forma parte de la pared medial del hemisferio cerebral desde el hipotálamo hasta la amígdala (Niuwenhuys *et al.*, 2009) y forma parte del sistema límbico (Snell, 2006). Las estructuras que forman parte del sistema límbico no solo están interconectadas entre sí y con las del hemisferio opuesto por complejas vías anatómicas, sino que también envían fibras de proyección a muchas partes del sistema nervioso; concretamente, el hipocampo envía fibras eferentes al tálamo, mesencéfalo e hipotálamo (Snell, 2006). Existen indicios de que el hipocampo está relacionado con la conversión de la memoria reciente en memoria a largo plazo. Una lesión del hipocampo determinará que el individuo afectado no pueda almacenar memoria de largo plazo, mientras que la memoria de los hechos ocurridos

antes de que se desarrollara la lesión no se ve afectada. Este trastorno se denomina amnesia anterógrada (Snell, 2006). Aunque el hipocampo es tradicionalmente reconocido como el centro de la memoria y del aprendizaje del cerebro, ha comenzado a emerger como un integrador de la cognición y la emoción (Jinno, 2016).

En nuestro trabajo, la administración oral de 10 mg/kg p.c., 5 días, de deltametrín indujo en hipocampo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de los aminoácidos neurotransmisores aspartato, glutamato y glutamina (Tabla 37). El proceso de excitotoxicidad se considera el principal mecanismo de muerte celular tanto en patologías agudas del SNC como el trauma cerebral (Amorini *et al.*, 2017), infarto/isquemia cerebral, epilepsia y lesiones cerebrales perinatales, como en desórdenes neurodegenerativos (Cooper y Jeitner, 2016). La “teoría excitotóxica” ha emergido como consecuencia del incremento de los aminoácidos excitadores y sobreactivación de los receptores glutamatérgicos o de cualquiera de sus análogos. Esto provoca la entrada masiva de calcio a la célula, lo que altera el potencial de membrana mitocondrial, interrumpe el flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico e impide el que se lleve a cabo la fosforilación oxidativa. Finalmente, la disfunción mitocondrial pone en marcha mecanismos de generación de radicales libres que conducen a procesos de muerte celular (Lorigados *et al.*, 2013; Prentice *et al.*, 2015). A la vista de los datos obtenidos, observamos que la administración de una dosis oral de 5 mg/kg p.c. de deltametrín no induce variaciones significativas en las concentraciones de aminoácidos excitadores, posiblemente porque se mantiene inalterado el ciclo metabólico glutámico-glutamina entre las neuronas y los astrocitos. Por el contrario, la administración de una dosis de 10 mg/kg p.c. de deltametrín induce un incremento de los aminoácidos aspartato, glutamato y glutamina, lo que parece

indicar la disrupción del ciclo neurona-astrocito/glutámico-glutamina, contribuyendo a la disminución de la tasa de eliminación del glutamato del espacio extracelular y a la consecuente exacerbación del efecto citotóxico producida por la elevada concentración del glutamato fuera de las células (Cooper y Jeitner, 2016). Al mismo tiempo, observamos también un aumento del aspartato, que, en condiciones fisiológicas es transformado en glutamato gracias al enzima aspártico aminotransferasa a través de la reacción:



produciendo así un incremento de la concentración de glutamato (Cooper y Jeitner, 2016).

Los datos obtenidos nos indican que la administración de deltametrín a las dosis ensayadas favorecería el desarrollo y progresión de un proceso de excitotoxicidad, dado que las alteraciones del perfil bioquímico preceden a las alteraciones estructurales a nivel del SNC (Dere *et al.*, 2007).

El deltametrín no produjo ningún efecto significativo sobre el sistema serotoninérgico en hipocampo a las pautas de administración del presente trabajo (Tabla 38). Sin embargo, un estudio previo de nuestro grupo de investigación demostró que el deltametrín inducía el descenso significativo de los niveles de serotonina y de su metabolito 5-HIAA en hipocampo cuando se administraban 20 mg/kg p.c. de deltametrín intraperitonealmente durante 6 días a ratas macho Wistar (Martínez-Larrañaga *et al.*, 2003). Estas diferencias podrían deberse en especial a las diferentes dosis utilizadas (notablemente más bajas en nuestro estudio), a la duración del tratamiento con deltametrín (seis días en el estudio de Martínez-Larrañaga *et al.*, y cinco días en nuestro trabajo), y a la distinta vía de administración del piretroide (la vía

intraperitoneal empleada por Martínez-Larrañaga *et al.* presenta mayor biodisponibilidad).

La rápida degradación de monoaminas del cerebro es esencial para el funcionamiento correcto de la neurotransmisión sináptica. Tras la administración oral de deltametrín a las dosis de 5 mg y 10 mg/kg p.c. evidenciamos un descenso significativo del contenido del metabolito de dopamina HVA y de la tasa metabólica (Tabla 39). La liberación de dopamina inducida por agentes químicos se ha evidenciado tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Kitazawa *et al.*, 2002), y se ha observado que el exceso de liberación de dopamina, y el consiguiente aumento de sus niveles en el espacio extraneuronal, pueden acelerar temporalmente los procesos de neurotoxicidad (Lotharius y O'Malley, 2000). Distintos grupos de investigación han demostrado que el exceso de liberación de dopamina origina apoptosis, que se ve potenciada por la presencia de agentes químicos (Terasaka *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 1999; Stokes *et al.*, 1999, 2000). Por tanto, el descenso en la tasa metabólica de dopamina en hipocampo tras la administración de deltametrín podría favorecer y acelerar el proceso de apoptosis neuronal.

Teniendo en cuenta las funciones en las que participan la corteza frontal y el hipocampo, las alteraciones observadas en estas regiones a consecuencia de la exposición al deltametrín a las dosis propuestas podrían corresponderse con diferentes patologías relacionadas con estados de ansiedad, retraso en el aprendizaje, alteraciones en procesos de memoria, y otros procesos neurodegenerativos.

El hipocampo y la corteza frontal emiten eferencias excitatorias hacia el cuerpo estriado (Cardinali, 2007). El cuerpo estriado se compone de una serie de núcleos subcorticales

interconectados que aparecieron por primera vez en el linaje de vertebrados hace aproximadamente 530 millones de años (Murray *et al.*, 2011) para el control del movimiento voluntario (Hikosaka *et al.*, 2000). Se compone de tres núcleos: caudado, lenticular (conformado a su vez por el putamen y el globo pálido) y estriado ventral. Este último contiene el núcleo accumbens (NAcc). El estriado está conectado con el núcleo ventral anterior del tálamo, y una banda de fibras nerviosas, la cápsula interna, lo divide casi por entero; el término estriado se utiliza debido al aspecto estriado producido por las bandas de sustancia gris que atraviesan la cápsula interna y conectan el núcleo caudado con el putamen del núcleo lenticular (Snell, 2006). El estriado es la estructura funcional receptora de aferencias a los ganglios basales (grandes estructuras neuronales subcorticales que forman un circuito de núcleos interconectados entre sí cuya función es la iniciación e integración del movimiento, pues reciben información de la corteza cerebral y del tronco del encéfalo, la procesan y proyectan de nuevo a la corteza, al tronco y a la médula espinal) (Snell, 2006). Las vías aferentes estriatales llegan de tres fuentes principales: corteza, mesencéfalo y tálamo, y recibe aferencias de todos los elementos del circuito de recompensa: a partir de células del mesencéfalo estriado-nigral (fibras estriado nigras), amígdala, corteza orbitofrontal (OFC) y corteza cingulada anterior (ACC) (Báez-Mendoza y Schultz, 2013). El estriado tiene dos vías eferentes principales. La vía directa está formada por axones de neurona espinosa mediana (MSN) que expresan receptores D1 que se proyectan principalmente a neuronas GABAérgicas en la sustancia negra pars reticulata (SNr) (Báez-Mendoza y Schultz, 2013). Las MSN que expresan receptores D2 se dirigen en su mayor parte al segmento externo del globo pálido (GPe) y forman la vía indirecta (Báez-Mendoza y Schultz, 2013). Las neuronas GABAérgicas en GPe proyectan a SNr y el segmento interno del globo pálido (GPi) (Báez-Mendoza y Schultz, 2013). El SNr y GPi son los núcleos de

salida de los ganglios basales. El tipo principal de célula en el cuerpo estriado es la MSN, que liberan GABA en sus terminales sinápticas (Báez-Mendoza y Schultz, 2013). Además contiene muchos otros tipos de células, incluyendo interneuronas colinérgicas y GABAérgicas de rápida descarga (Báez-Mendoza y Schultz, 2013). El cuerpo estriado contiene actividad neuronal relacionada con movimientos y recompensas. Las neuronas estriatales muestran actividad relacionada con la preparación, inicio y ejecución de movimientos (Hollerman *et al.*, 2000).

En nuestro trabajo, en cuerpo estriado, tras la administración oral de deltametrín a dosis de 5 y 10 mg/kg p.c., observamos un descenso generalizado y estadísticamente significativo de todos los aminoácidos (Tabla 37): aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA, confirmando así el efecto neurotóxico y la afinidad del deltametrín sobre esta región cerebral. Al igual que lo que ocurre en la corteza frontal, el descenso en las concentraciones de taurina y GABA dificultaría el balance homeostático entre neurotransmisores excitadores e inhibidores. Esta pérdida de equilibrio entre aminoácidos favorecería el daño oxidativo y la degeneración neuronal inducida por deltametrín. Además, el sistema GABAérgico tiene un importante papel en la formación y la consolidación de la memoria, y existen evidencias de que modificaciones en áreas GABAérgicas del cerebro originan cambios en la memoria (Dere *et al.*, 2007). Sabiendo que existe un elevado número de neuronas GABAérgicas en el estriado (Calabresi *et al.*, 2000), podríamos afirmar que la neurotoxicidad que induce el deltametrín en esta región cerebral podría ser, al menos en parte, debida al descenso que induce el piretroide sobre la concentración de este aminoácido inhibidor. En este sentido, sabemos que la enfermedad de Huntington afecta principalmente a las MSN GABAérgicas, cuya pérdida se acompaña de un aumento en el número de astrocitos reactivos y de la

depleción en estriado de todos los marcadores asociados con las neuronas GABAérgicas (GABA, sustancia P y metionina-encefalina). Los niveles de dopamina y mayormente los niveles de serotonina, en nuestro estudio también se ven alterados (Tabla 38 y Tabla 39).

Aunque las proyecciones serotoninérgicas están distribuidas por todo el SNC, el estriado es una región con alta densidad de innervación serotoninérgica. Martínez-Larrañaga *et al.* (2003) encontraron que a altas dosis de exposición del deltametrín (20 mg/kg durante 6 días administradas intraperitonealmente a ratas macho Wistar) se producía un descenso significativo del contenido de serotonina y de su metabolito 5-HIAA en cuerpo estriado. En nuestro estudio, el descenso de los niveles de 5-HT y 5-HIAA fue dosis-dependiente (Tabla 38). En este sentido, Hossain *et al.* (2013) observaron que el deltametrín reduce de forma dosis-dependiente los niveles extracelulares de serotonina en el cuerpo estriado de ratas Sprague-Dawley despiertas, y que a dosis de 10 mg/kg de deltametrín administrado intraperitonealmente, se producía una disminución del 58% en la liberación de serotonina a los 60 minutos de su administración para luego volver de forma progresiva a los valores del grupo control.

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo progresivo, principalmente idiopático y relacionado con la edad, que afecta al 1% de la población por encima de los 60 años de edad (De Lau y Breteler, 2006). Aunque los factores genéticos juegan un papel destacado, en algunos casos factores ambientales como la exposición a pesticidas han sido ampliamente señalados en la etiología del Parkinson idiopático a través de informes de casos clínicos, encuestas epidemiológicas y modelos animales (Barlow *et al.*, 2007). El Parkinson causa severas disfunciones posturales,

motoras y fisiológicas que reducen la esperanza de vida. Si bien es una enfermedad sistémica que afecta al SNC y SNP, los síntomas motores más incapacitantes se deben a la progresiva muerte de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc), un núcleo mesencefálico que envía proyecciones al cuerpo estriado y que está implicado en el control motor (d'Anglemon de Tassigny *et al.*, 2015), y por una reducción de la concentración de dopamina en el estriado (Park *et al.*, 2016). La extensión neuronal que parte desde la sustancia negra y llega hasta el estriado marca una zona en el cerebro conocida bajo el nombre de vía nigroestriatal. La degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en el SNpc sugiere que la dopamina misma puede ser una fuente de estrés oxidativo (Segura-Aguilar *et al.*, 2014). Cada vez gana más fuerza la idea de que la disfunción mitocondrial es la llave determinante de la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas en el Parkinson (y en otros procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y de Huntington), tanto en la enfermedad familiar como en la esporádica, así como en el Parkinson inducido por tóxicos (Ryan, *et al.*, 2015). Alteraciones de la función mitocondrial se asocian con degeneración celular y muerte (Carvalho *et al.*, 2015).

Al cuerpo estriado se le viene apuntando como una de las regiones cerebrales más sensibles a la acción tóxica de los piretroides (Kirby *et al.*, 1999) y, más concretamente, las terminaciones nerviosas dopaminérgicas del estriado parecen presentar una mayor sensibilidad a los piretroides que las proyecciones serotoninérgicas y/o las glutaminérgicas (Kirby *et al.*, 1999). En nuestro estudio, en cuerpo estriado, los niveles de dopamina y de sus metabolitos se han visto tan afectados como los niveles de 5-HT y 5-HIAA, se aprecia una disminución significativa de dopamina y de sus metabolitos y un aumento de la tasa metabólica (Tabla 39), sugiriendo que el deltametrín incrementa

el catabolismo de la dopamina a nivel del estriado. El deltametrín causa un descenso en los niveles de dopamina tanto en estudios llevados a cabo tanto *in vitro* (Liu y Shi, 2006) como *in vivo* (Liu *et al.*, 2006), lo cual se ha relacionado con la enfermedad de Parkinson. En un ensayo llevado a cabo con dosis similares a las utilizadas en nuestro estudio (6,25 y 12,5 mg/kg p.c. de deltametrín administrado vía oral) y durante 10 días se observó, a la dosis más alta ensayada, un descenso estadísticamente significativo del contenido de dopamina en el cuerpo estriado de ratas. Sin embargo, los niveles de los metabolitos de dopamina, DOPAC y HVA aumentaron significativamente lo cual se corrobora con incrementos en la tasa metabólica (Liu *et al.*, 2006). Además, en este estudio se evidenció la afinidad que posee el deltametrín por esta región cerebral al dañar selectivamente las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, inhibiendo la expresión de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de dopamina. Cuando la muerte neuronal afecta a más del 50% de las neuronas de la vía nigroestriatal, la concentración de dopamina en el estriado disminuye considerablemente (López-Barneo, 2012). De hecho, se ha demostrado que los síntomas de la enfermedad de Parkinson comienzan sobre la pérdida del 80% de las células dopaminérgicas nigroestriales, con una depleción de la dopamina en cuerpo estriado del 50% (Kirby *et al.*, 1999). La falta de afectación, de forma dosis-dependiente, del contenido de dopamina y de sus metabolitos en nuestro estudio podría deberse a que la destrucción en neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra todavía no ha alcanzado los niveles a los que se producen dichos efectos, es decir, que nos encontraríamos en fases tempranas de degeneración neuronal. Podemos asumir que las diferencias de nuestro trabajo con el estudio de Liu *et al.* (2006) podrían principalmente deberse a las dosis estudiadas, y especialmente al período de exposición al deltametrín (la duración del estudio de Liu *et al.* es el doble que la de nuestro trabajo).

Durante el desarrollo de la enfermedad de Parkinson, la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales también causa disfunción de las rutas basales-talámicas y cerebelo-talámicas (Rolland *et al.*, 2007). Analizando imágenes cerebrales obtenidas mediante resonancia magnética de pacientes con Parkinson, se detectó la hiperactivación del cerebelo (Wu y Hallett, 2005), lo que se ha interpretado como una estrategia del SNC para compensar la disfunción de los ganglios basales (Sabatini *et al.*, 2000). El cerebelo, ubicado en la fosa craneal posterior (Snell, 2006), procesa la información procedente de un gran número de regiones, que incluyen la médula espinal, el tronco encefálico y la corteza cerebral. Sus proyecciones se dirigen hacia diferentes centros involucrados en las adaptaciones posturales y en la generación de movimientos (Snell, 2006). Macroscópicamente, está conformado por dos hemisferios unidos por un vérmix conectado a la cara posterior del troncoencéfalo por tres haces simétricos de fibras nerviosas denominados pedúnculos cerebelosos superior, medio e inferior (Snell, 2006). El cerebelo consta además de tres lóbulos principales: anterior, medio y floclonodular (Snell, 2006) y está constituido por una cubierta externa de sustancia gris y una interna de sustancia blanca. La sustancia gris es una estructura uniforme dividida en tres capas: la capa molecular (capa externa), la capa de células de Purkinje (capa media) y la capa granular (capa interna) (Snell, 2006). Las fibras trepadoras (proyecciones del bulbo raquídeo) y musgosas (proyecciones del resto del encéfalo, tronco encefálico y médula) constituyen las dos líneas principales de aferencias excitatorias hacia la corteza cerebelar (Snell, 2006). Los impulsos inhibidores fluctuantes son transmitidos por las células de Purkinje a los núcleos intracerebelosos, los cuales a su vez modifican la actividad muscular a través de las áreas de control motor del tronco encefálico y la corteza cerebral. El cerebelo es una parte importante del circuito neuronal, críticamente implicada en procesos cognitivos complejos,

comportamiento, emociones, coordinación motora, y muchos tipos de aprendizaje y memoria (Schmahmann, 1997). Así, gradúa y armoniza el tono muscular y mantiene la postura corporal normal. Permite que los movimientos voluntarios como la deambulaci3n se lleven a cabo suave y de manera precisa. Uno de los signos m1s característicos de daño cerebelar es la ataxia o incoordinaci3n ambulatoria (Morton y Bastian, 2004). En esta l3nea, la neurotoxicidad inducida por deltametr3n se caracteriza por ataxia, p3rdida de coordinaci3n, hiperexcitabilidad, convulsiones y parálisis, junto con un descenso generalizado de la actividad motora (Yadav *et al.*, 2006; Dayal *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 1989b). Tras la administraci3n de deltametr3n a una dosis de 10 mg/kg p.c. durante 5 d3as), observamos que las ratas mostraron un descenso de la actividad motora con ligera incoordinaci3n. Asimismo, evidenciamos en cerebelo un aumento estadísticamente significativo de las concentraciones plasmáticas de aspartato, glutamato y glutamina a la dosis de 10 mg/kg p.c. de deltametr3n, junto con un incremento significativo tambi3n de los niveles de aspartato a la dosis de 5 mg/kg p.c. de deltametr3n (Tabla 37), que se traducir3a en un proceso de hiperexcitabilidad cerebelar dosis-dependiente. En condiciones fisiol3gicas normales, la liberaci3n masiva de aminoácidos neurotransmisores excitadores ser3a contrarrestada por el aumento simultáneo de la liberaci3n de aminoácidos neurotransmisores inhibidores, tales como el GABA y la taurina (Saransaari y Oja, 1997, 1998). Sin embargo, tras la administraci3n oral de deltametr3n a las dos dosis ensayadas, 5 y 10 mg/kg p.c durante 5 d3as, los niveles de GABA y taurina permanecen inalterados a nivel del cerebelo.

La disrupci3n en la homeostasis de la neurotransmisi3n aminoacid3rgica tiene una destacada importancia en la enfermedad de Parkinson. Así, en un reciente estudio en el cerebelo de ratas modelo para la enfermedad de Parkinson inducida mediante inyecci3n intraestriatal de rotenona (Khadrawy *et al.*, 2017) se ha observado un incremento

significativo de los aminoácidos glutamato y aspartato junto con una disminución de los neurotransmisores GABA, glicina y taurina, asociándose con daño celular, vacuolización perineuronal y necrosis de las células de Purkinje. En este sentido, Heman *et al.* (2012) demostraron que la hiperactividad de las células de Purkinje se correlacionaba con la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra de monos modelo para la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, también se ha argumentado que la hiperactivación cerebelar podría relacionarse con signos específicos de la enfermedad de Parkinson, como la rigidez (Kleine *et al.*, 2001). Tanto si el aumento de la actividad cerebelar forma parte de la patogenia del Parkinson, como si sirve de mecanismo compensatorio, el aumento observado de los aminoácidos glutamato y aspartato en cerebelo, puede conllevar estrés oxidativo y muerte neuronal (Khadrawy *et al.*, 2017).

Además de recibir aferencias somáticas, viscerales, visuales y olfatorias, el hipotálamo tiene conexiones aferentes con la corteza frontal, hipocampo, tálamo y mesencéfalo (Snell, 2006). El hipotálamo es una región anatómica del diencefalo o cerebro anterior localizada entre el tercer ventrículo y la lámina terminal (límite interno), tálamo (límite superior) y globo pálido, cápsula interna, región subtalámica y pedúnculos cerebrales (límite posterior y lateral) (Niuwenhuys *et al.*, 2009). Es un centro de regulación y control hormonal (Caravaca Rodríguez *et al.*, 2005). A grandes rasgos, las neuronas hipotalámicas se dividen en dos tipos: neurosecretoras, responsables de la producción de hormonas liberadoras o inhibidoras y neurovegetativas, liberadoras de neurotransmisores cuya acción principal es actuar sobre el SNC a la vez que estimulan la secreción de hormonas (Caravaca Rodríguez *et al.*, 2005). El hipotálamo, a su vez, se comunica de manera directa con la glándula hipofisaria a través del tallo hipofisario o

infundibulum (Alcaráz, 2001). A este nivel se localizan los núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de una amplia variedad e importantes funciones como la regulación de los ritmos circadianos y el ciclo de sueño y vigilia, el control de la temperatura corporal y de la secreción renal, la regulación de las emociones y el comportamiento, el control de los sistemas simpático y parasimpático, la modulación de la ingesta de alimentos y agua, y la regulación de las funciones metabólicas y viscerales a través de la hipófisis (Snell, 2006). La glándula hipofisaria o pituitaria está constituida por dos lóbulos, el anterior o adenohipófisis, y el posterior o neurohipófisis (Alcaráz, 2001). En esta región se establece la conexión entre los dos grandes sistemas de regulación, el nervioso y el endocrino. La hipófisis, a su vez, ejerce una función reguladora sobre el funcionamiento de otras glándulas endocrinas a través de la liberación de hormonas (Caravaca Rodríguez *et al.*, 2005). Al existir una estrecha relación funcional entre la hipófisis y el hipotálamo, este último ejerce sobre la hipófisis una influencia inhibidora o excitadora. Así, los núcleos hipotalámicos se comunican con la adenohipófisis a través del sistema portal hipofisario (comunicación vascular), y con la neurohipófisis a través del tracto hipotalámico-hipofisario (comunicación neuronal) (Caravaca Rodríguez *et al.*, 2005).

Teniendo en cuenta la estrecha relación existente entre el hipotálamo y la hipófisis, se procede a analizar conjuntamente los resultados obtenidos en ambas regiones cerebrales. Tras la administración oral de deltametrín durante 5 días consecutivos a una dosis de 5 mg/kg p.c. se produjo un incremento significativo de glutamina (Tabla 37). Existe una relación metabólica glutámico-glutamina/GABA entre las neuronas y los astrocitos (Cooper y Jeitner, 2016), cuya disrupción induce un aumento en la concentración extracelular de los aminoácidos excitadores tipo glutamina. Además,

existen evidencias del papel modulador que ejerce la glutamina frente a la toxicidad inducida por deltametrín en diferentes modelos *in vitro* (Aydin *et al.*, 2015; Gündüz *et al.*, 2015; Varol *et al.*, 2016). Wu y Liu (2000) demostraron que el deltametrín induce neurodegeneración tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, el estrés oxidativo, a través de un proceso de peroxidación lipídica y generación de especies reactivas, es uno de los principales mecanismos inductores de neurotoxicidad del deltametrín (Romero *et al.* 2012). La glutamina es el aminoácido más abundante en el cuerpo y desempeña múltiples funciones: regula la síntesis y degradación proteica, el equilibrio ácido-base, el sistema inmune y mejora la adaptación al estrés. Además, es la precursora del GSH, que es el antioxidante corporal más importante, y contribuye junto a él en la defensa frente a oxidantes (Gündüz *et al.*, 2015). Sabemos, por tanto, que la glutamina tiene una función neuroprotectora pues afecta al estrés oxidativo y a la inflamación (Peng *et al.*, 2006). Varol *et al.* (2016) demostraron que la intoxicación por deltametrín administrado oralmente a una única dosis de 35 mg/kg p.c. aumenta el daño oxidativo en cerebro y la degeneración neuronal en ratas Wistar, y que la suplementación oral con 1,5 g/kg p.c. de glutamina a las 4 horas de recibir el tratamiento con deltametrín disminuye la toxicidad del piretroide en el tejido cerebral por reducción del daño oxidativo. De manera general, las alteraciones observadas en los distintos neurotransmisores estudiados en esta región cerebral podrían conllevar cambios en el patrón cronobiológico del animal y modificar el ciclo de sueño y vigilia (Inouye y Kawamura, 1979). Un estudio reciente ha relacionado la existencia de elevados niveles de glutamina en cerebro con el desarrollo de edema cerebral (Cooper y Jeitner, 2016). En nuestro caso, el aumento que observamos de los niveles de glutamina en hipotálamo tras la administración de deltametrín podría estar favoreciendo la edematización del tejido hipotalámico.

Dado que las neuronas aminoacidérgicas del hipotálamo anterior vierten su contenido en los vasos portahipofisarios (Conrad y Pfaff, 1976), en nuestro estudio tras la administración oral de 5 mg/kg p.c. de deltametrín, también observamos un aumento estadísticamente significativo en los niveles de glutamina a nivel hipofisario (Tabla 37).

En referencia al contenido de catecolaminas, tanto en hipotálamo como en la hipófisis se observa una correlación como consecuencia de su estrecha relación funcional. A nivel hipotalámico, tras la administración de deltametrín a las dosis de 5 y 10 mg/kg p.c durante 5 días consecutivos, se observó un descenso en los niveles de serotonina (5-HT) y un aumento significativo de su tasa metabólica (Tabla 38). En la hipófisis, y dada la relación fisiológica existente con el hipotálamo, tras la administración oral con deltametrín a una dosis de 5 mg/kg p.c también observamos un descenso de los niveles de 5-HT y un aumento de la tasa metabólica (Tabla 38).

Aunque la liberación de dopamina puede verse potenciada por la presencia de agentes químicos (Kitazawa et al., 2002), acelerando los procesos de neurotoxicidad y muerte celular neuronal (Miller *et al.*, 1999; Lotharius y O'Malley, 2000; Terasaka *et al.*, 2000; Stokes *et al.*, 1999, 2000), en el presente trabajo, a nivel hipotalámico no se evidenció tras la administración oral de deltametrín a dosis de 5 y 10 mg/kg p.c. durante 5 días depleción de dopamina (Tabla 39). Sin embargo, a nivel hipofisario, observamos una reducción de los niveles dopamina, del metabolito HVA y de su tasa metabólica (Tabla 39). Teniendo en cuenta las aferencias dopaminérgicas que recibe la hipófisis del hipotálamo (Freeman *et al.*, 2000), los efectos del deltametrín a nivel hipofisario podrían suplantar a lo observado a nivel hipotalámico, y cuya consecuencia principal sería una disrupción entre ambos tejidos cerebrales.

Alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-órgano diana como las sugeridas en nuestro trabajo podrían estar implicadas en procesos de disrupción endocrina, puesto que los piretroides se han relacionado con la alteración del sistema endocrino, pudiendo afectar negativamente a la reproducción y al desarrollo sexual, así como al sistema inmunológico, si bien sus interacciones con los receptores hormonales aún no están claras (Bian *et al.*, 2004; Pine *et al.*, 2008).

El mesencéfalo se ubica en la parte superior del tronco encefálico, adyacente rostralmente al diencefalo (tálamo e hipotálamo) (Ruchalski y Hathout, 2012). Dada su proximidad a la corteza cerebral, cerebelo y tronco cerebral, el mesencéfalo proyecta múltiples aferencias a estas estructuras (Ruchalski y Hathout, 2012). Entre sus funciones, destacamos su importante papel en el procesamiento de la información visual y auditiva, así como en el control motor (Ruchalski y Hathout, 2012). El deltametrín, a las dosis ensayadas en nuestro trabajo, no modifica el contenido en los aminoácidos neurotransmisores en mesencéfalo (Tabla 37). Dado que el glutámico, la glutamina, el aspártico y GABA están metabólicamente relacionados (Cooper y Jeitner, 2016), el deltametrín, en esta región cerebral, no induciría una disrupción metabólica. En el presente trabajo, en mesencéfalo, el sistema dopaminérgico se ha visto alterado con una disminución, dosis dependiente, de los niveles de dopamina y de su metabolito DOPAC (Tabla 39). Por el contrario, tras la administración oral de deltametrín a la dosis de 5 y 10 mg/kg p.c, 5 días, no se observó un efecto estadísticamente significativo en los niveles de serotonina y de su principal metabolito, el 5-HIAA, (Tabla 38). La práctica totalidad de los trastornos psiquiátricos parecen estar relacionados con disfunciones serotoninérgicas (depresión, trastornos de ansiedad, trastornos de la alimentación, esquizofrenia, trastornos del control de los impulsos, autismo y comportamientos

agresivos, por mencionar los principales), y muchos de los fármacos psicotrópicos utilizados para tratar condiciones psicopatológicas interfieren indirecta o directamente con el sistema serotoninérgico (Marazziti, 2017). A dosis más elevadas que las utilizadas en este trabajo, 20 mg/kg p.c. de deltametrín, vía intraperitoneal, durante seis días consecutivos en ratas macho Wistar, las concentraciones de serotonina y del 5-HIAA se vieron significativamente reducidas, mientras que la tasa de recambio de la serotonina se incrementó en esta región cerebral, sugiriendo la depleción de la serotonina (Martínez-Larrañaga *et al.*, 2003). Estas diferencias podrían deberse fundamentalmente a que la dosis utilizada en el estudio de Martínez-Larrañaga *et al.* fue de 20 mg/kg en lugar de 10 mg/kg, siendo además mayor la duración del tratamiento con deltametrín (seis días en el estudio de Martínez-Larrañaga *et al.*, y cinco días en nuestro trabajo), y utilizándose la vía intraperitoneal frente a la vía oral, usada en nuestro diseño experimental para administrar el piretroide.

El bulbo raquídeo o médula oblongada, se corresponde con la parte más distal del tronco cerebral. Además de la transmisión de impulsos de la médula espinal al cerebro, el bulbo se encarga de procesos tales como la regulación de la secreción del jugo digestivo, la tos, el vómito, el estornudo y la deglución (Hughes y Wiles, 1998; De Bruyn *et al.*, 2017). En esta región cerebral, tras administrar a ratas macho adultas dosis orales de deltametrín de 5 y 10 mg/kg p.c. durante 5 días consecutivos, se observó una reducción estadísticamente significativa y dosis-dependiente de la concentración de glutamina (Tabla 37). La glutamina ha sido propuesta como un potencial agente neuroprotector frente a procesos de estrés oxidativo e inflamatorios (Peng *et al.*, 2006), y recientemente, en un estudio *in vivo*, se ha evidenciado como la suplementación exógena de glutamina reduce el daño oxidativo inducido por deltametrín en SNC (Varol

et al., 2016). Una disminución de los niveles de glutamina terminaría por deplecionar el contenido de GSH (Gündüz *et al.*, 2015), molécula fundamental para contrarrestar los procesos oxidativos y mantener el balance redox celular (Meiser *et al.*, 2016). Los niveles reducidos de glutamina en el bulbo raquídeo tras la administración de deltametrín a ambas dosis de tratamiento, favorecerían el que, en esta región cerebral, se produjeran eventos oxidativos que conducirían a un proceso de muerte celular neuronal. Entre sus múltiples funciones, la glutamina dona grupos nitrógeno para la síntesis de nucleótidos, por lo que una reducción en su contenido, también causaría daño a nivel del ADN celular. (Meiser *et al.*, 2016). A la vista de los resultados obtenidos, el descenso de los niveles de glutamina en el bulbo raquídeo podría actuar como marcador de daño neuronal tras la administración de deltametrín. Por tanto, la suplementación exógena de este aminoácido neurotransmisor podría reducir el daño neuronal por la exposición a este piretroide. Posteriores investigaciones a este nivel son necesarias para aclarar este mecanismo sugerido.

En función de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo, se debe destacar que el piretroide Tipo II deltametrín puede originar de forma dosis-dependiente, una depleción de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA principalmente en las regiones cerebrales corteza frontal y cuerpo estriado, así como también una depleción de dopamina y serotonina en cuerpo estriado, efectos que pueden contribuir a inducir desordenes neurodegenerativos en la población expuesta. Nuestros resultados deben ser tomados en cuenta en futuras evaluaciones del riesgo de este tipo de insecticidas a efectos de salud pública.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El presente trabajo de investigación evalúa el efecto neuroquímico, sobre el sistema aminoacidérgico del SNC, del insecticida piretroide Tipo II deltametrín (a las dosis de 5 y 10 mg/kg p.c./día, vía oral, durante 5 días). En concreto se evalúa (1) los niveles de noradrenalina (NA); (2) los niveles de dopamina (DA) y de sus metabolitos el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido homovanílico (HVA); (3) los niveles de 5-HT y de su metabolito 5-HIAA, y (4) los niveles de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA en las regiones cerebrales corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo, hipotálamo, hipófisis, bulbo raquídeo y mesencéfalo.
2. El deltametrín (5 y 10 mg/kg p.c./día, durante 5 días) origina un aumento estadísticamente significativo, dosis-dependiente, de los niveles de NA en todas las regiones estudiadas (corteza frontal, hipocampo, cuerpo estriado, cerebelo, hipotálamo, hipófisis, mesencéfalo y bulbo raquídeo), efecto que sugiere que la NA está ejerciendo un papel neuromodulador frente a los procesos de excitotoxicidad y daño neuronal ejercido por deltametrín.
3. El deltametrín a nivel de la corteza frontal induce:
 - a. Una reducción dosis-dependiente de los niveles de los aminoácidos neurotransmisores estudiados (aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA), que sugiere una puesta en marcha de procesos de muerte neuronal.
 - b. Un descenso significativo de los niveles de taurina, que podría servir de marcador para prevenir el daño neuronal por apoptosis.

- c. Un descenso significativo en los niveles de serotonina (5-HT) y un aumento en la tasa de recambio.
4. El deltametrín a nivel del hipocampo induce:
- a. Un incremento dosis-dependiente de los niveles de los aminoácidos aspartato, glutamato y glutamina, indicando la disrupción del ciclo neurona-astrocito/glutámico-glutamina, contribuyendo al desarrollo y progresión de un proceso de excitotoxicidad.
 - b. Un descenso de los niveles del metabolito HVA y de la tasa metabólica de dopamina que pudiera favorecer un proceso de muerte neuronal.
5. El deltametrín a nivel del cuerpo estriado induce:
- a. Un descenso generalizado en todos los aminoácidos neurotransmisores estudiados (aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA), confirmando el efecto neurotóxico y la afinidad del deltametrín sobre esta región cerebral.
 - b. Un descenso dosis-dependiente de los niveles de serotonina (5-HT) y de su metabolito 5-HIAA.
 - c. Un descenso de los niveles de dopamina (DA) y de sus metabolitos DOPAC y HVA.
6. El deltametrín a nivel del cerebelo induce de forma dosis-dependiente:
- a. El desarrollo de hiperexcitabilidad cerebelar en base al aumento observado de los aminoácidos aspartato, glutamato y glutamina.

7. El deltametrín a nivel del hipotálamo e hipófisis induce:
 - a. Un aumento de los niveles de glutamina en ambos tejidos, de acuerdo con su papel neuroprotector.
 - b. Una disminución de los niveles de serotonina (5-HT) en hipotálamo y en la hipófisis.
 - c. Una disminución de los niveles de dopamina (DA) y de su metabolito HVA y de la tasa metabólica en la hipófisis, favoreciendo el proceso de apoptosis neuronal, y sugiriendo la disrupción dopaminérgica entre ambos tejidos.

8. El deltametrín a nivel del bulbo raquídeo induce:
 - a. Un descenso de los niveles de glutamina, sugiriéndose que este aminoácido podría servir de marcador del daño neuronal por estrés oxidativo.

9. El deltametrín a nivel del mesencéfalo induce de forma dosis dependiente:
 - a. Un descenso de los niveles de dopamina y de su metabolito DOPAC.

10. En función de todos los resultados obtenidos en el presente trabajo, cabe destacar que el piretroide Tipo II deltametrín puede originar una depleción de los aminoácidos aspartato, glutamato, glutamina, taurina y GABA principalmente en las regiones cerebrales corteza frontal y cuerpo estriado, así como también una depleción de dopamina y serotonina en cuerpo estriado, efectos que pueden contribuir a inducir desordenes neurodegenerativos en la población expuesta.

11. Tomando en conjunto las alteraciones observadas en los niveles de serotonina y dopamina se sugiere que ambos neurotransmisores son diana de los plaguicidas piretroides Tipo II. El sistema serotoninérgico y el sistema dopaminérgico nigroestriatal parece ser el lugar imperativo en mediar algunos de los efectos neurotóxicos originados por estos plaguicidas. Nuestros hallazgos de efectos neuroquímicos pueden hacer considerar a los piretroides Tipo II como neurotoxinas de aminoácidos neurotransmisores y de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico. Se necesitan estudios posteriores en sistemas *in vivo* e *in vitro* para caracterizar los efectos neurotoxicológicos de los piretroides principalmente a nivel del sistema dopaminérgico nigroestriatal que nos aporten nuevos datos con el fin de poder considerar a los piretroides Tipo II como un factor de riesgo potencial para desordenes neurodegenerativos.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

ABALIS, I.M., ELDEFRAWI, M.E., ELDEFRAWI, A.T. (1986). Effects of insecticides on GABA-induced chloride influx into rat brain microsacs. *Journal of Toxicology and Environmental health*, 18: 13-23.

ABDEL-KHALIK, M.M., HANAFY, M.S., ABDEL-AZIZ, M.I. (1993). Studies on the teratogenic effects of deltamethrin in rats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 100(4):142-143.

ADHIKARI, A., TOPIWALA, M.A., GORDON, J.A. (2010). Synchronized Activity between the Ventral Hippocampus and the Medial Prefrontal Cortex during Anxiety. *Neuron*, 65: 257-269.

AKUNNE, H.C., SOLIMAN, K.F. (1994). Serotonin modulation of pain responsiveness in the aged rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 48: 411-416.

ALBRECHT, J., SCHOUSBOE, A. (2005). Taurine interaction with neurotransmitter receptors in the CNS: an update. *Neurochemical Research*, 30: 1615-1621.

ALCARAZ ROMERO, V.M. (2001). Estructura y función del sistema nervioso: recepción sensorial y estados del organismo. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. (México D.F.), 65-106.

ALDRIDGE, W.N., CLOTHIER, B., FORSHAW, P., JOHNSON, M.K., PARKER, V.H., PRICE, R.J., SKILLETER, D.N., VERSCHOYLE, P.D., STEVENS, C. (1978). The effect of DDT and the pyrethroid cismethrin and decamethrin on the acetylcholine and cyclic nucleotide content of rat brain. *Biochemical Pharmacology*, 27: 1703-1706.

ALVES, A.M., SYMINGTON, S.B., LEE, S.H., CLARK, J.M. (2010). PKC-dependent phosphorylations modify the action of deltamethrin on rat brain N-type (Cav2.2) voltage-sensitive calcium channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 101-108.

AMORINI, A.M., LAZZARINO, G., DI PIETRO, V., SIGNORETTI, S., LAZZARINO, G., BELLI, A., TAVAZZI, B. (2017). Severity of experimental traumatic brain injury modulates changes in concentrations of cerebral free amino acids. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol 21, 3: 530-542.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., MARTÍNEZ, M.A., MARTÍNEZ, M. (2006). Perspectives of pyrethroid insecticides toxicity. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29 (Suppl. 1): 315-317.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., MARTÍNEZ, M.A. (2009) Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 182: 7-20.

ANADÓN, A., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., DÍAZ, M.J., FERNÁNDEZ, M.C., MARTÍNEZ, M.A. (1996). Toxicokinetics of deltamethrin and its 4'-HO-Metabolite in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 141: 8-16.

- ARSLAN, H., ALTUN, S., ÖZDEMİR, S. (2017). Acute toxication of deltamethrin results in activation of inos, 8-ohdg and up-regulation of caspase 3, inos gene expression in common carp (*Cyprinus carpio* l.). *Aquatic Toxicology*, 187:90-99.
- ARUOMA, O.I., HALLIWELL, B., HOEY, B.M., BUTLER, J. (1988). The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursor. *Biochemical Journal*, 256: 251-255.
- ASTON-JONES, G. (2005). Brain structures and receptors involved in alertness. *Sleep Medicine*, 6(1), S3–S7.
- AYDIN, M., YILDIZ, A., IBILOGLU, I., EKINCI, A., ULGER, B.V., YUKSEL, M., BILIK, M.Z., OZAYDOGDU, N., EKINCI, C., YAZGAN, U.C. (2015). The protective role of glutamine against acute induced toxicity in rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 25(4):296-301.
- BÁEZ-MENDOZA, R. Y SCHULTZ, W. (2013). The role of the striatum in social behavior. *Frontiers of Neuroscience*, 10 December 2013. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00233>
- BARLOW, B.K., CORY-SLECHTA, D.A., RICHFIELD, E.K., THIRUCHELVAM, M. (2007). The gestational environment and Parkinson's disease: evidence for neurodevelopmental origins of neurodegenerative disorder. *Reproductive Toxicology*, 23: 457-470.
- BARNES, J.M. AND VERSCHOYLE, R.D. (1974). Toxicity of new pyrethroid insecticide. *Nature*, 248: 711.
- BARNSTABLE, C.J., WEI J.Y., HAN, M.H. (2004). Modulation of synaptic function by cGMP and cGMPgated cation channels. *Neurochemistry International*, 45: 875-884.
- BASS, C., SCHROEDER, I., TURBERG, A., FIELD, L.M., WILLIAMSON, M.S. (2004). Identification of mutations associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of the cat flea, *Ctenocephalides felis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34: 1305-1313.
- BECHARA, A., DAMASIO, H, DAMASIO, A.R. (2000). Emotion, decision – making and the orbitofrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 10: 295-307.
- BENARROCH, E. E. (2009). The locus coeruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance. *Neurology*, 73: 1699–1704.
- BENAVIDES, J., GUILLOUX, F., ALLAM, D., UZAN, A., MIZOULE, J., RENAULT, C., DUBROEUCQ, M., GUEREMY, C., LEFUR, G. (1984). Opposite effects of an agonist, Ro5-4864, and an antagonist, PK11195, of the peripheral type benzodiazepine binding sites on audiogenic seizures in DBA/2J mice. *Life Sciences*, 34: 2613-2620.
- BERRIDGE, C. W., SCHMEICHEL, B. E., ESPANA, R. A. (2012). Noradrenergic modulation of wakefulness/arousal. *Sleep Medicine Reviews*, 16: 187–197.
- BIAN, Q., XU, L.C., WANG, S.L., XIA, Y.K., TAN, L.F., CHEN, J.F., SONG, L., CHANG, H.C., WANG, X.R. (2004). Study on the relation between occupational

- fenvaterate exposure and spermatozoa DNA damage of pesticide factory workers. *Occupational and Environmental Medicine*, 61: 999-1005.
- BICKMEYER, U., WEINSBERG, F., WIEGAND, H. (1994). Effects of deltamethrin on catecholamine secretion of bovine chromaffin cells. *Archives of Toxicology*, 68: 532-534.
- BLISS, T. V. P., COLLINGRIDGE, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39.
- BLOOM, A.S. STAATZ, C.G., DIERINGER, T. (1983). Pyrethroid effects on operant responding and feeding. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 5: 321-324.
- BLOOMQUIST, J.R. (1998). Chemistry and toxicology of the chlorinated cyclodienes and lindane. *Reviews in Toxicology*, 2: 333-355.
- BLOOMQUIST, J.R. (1993). Neuroreceptor mechanisms in pyrethroid mode of action and resistance. In "Reviews in Pesticide Toxicology" (M. Roe and R. J. Kuhr, eds.). Toxicology Communications, Raleigh, NC, Vol 2: 181-226.
- BLOOMQUIST, J.R., ADAMS, P.M., SODERLUND, D.M. (1986). Inhibition of γ -aminobutyric acid-stimulated chloride flux in mouse brain vesicles by polychloroalkane and pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 7: 11-20.
- BLOOMQUIST, J.R., SODERLUND, D.M. (1985). Neurotoxic insecticides inhibit GABA-dependent chloride uptake by mouse brain vesicles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 133: 37-43.
- BLUNDELL, G., BRYDON, W.G., (1987). High performance liquid chromatography of plasma aminoacids using orthophthalaldehyde derivatisation. *Clinica Chimica Acta*, 170: 79-83.
- BODE, B.P. (2001). Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *Journal of Nutrition*, 131: 2475-2485.
- BORG, J.J., HANCOX, J.C., SPENCER, C.I., KOZLOWSKI, R.Z. (2002). Tefluthrin modulates a novel anionic background conductance (I_{AB}) in guinea-pig ventricular myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292: 208-215.
- BORG, J.J., HANCOX, J.C., ZHANG, H., SPENCER, C.I., LI, H., KOZLOWSKI, R.Z. (2007). Differential pharmacology of the cardiac anionic background current I_{AB} . *European Journal of Pharmacology*, 569: 163-170.
- BORMANN, J. (2000). The "ABC" of GABA receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21: 16-19.
- BRADBERRY, S.M., CAGE, S.A., PROUDFOOT, A.T., VALE, J.A. (2005). Poisoning due to pyrethroids. *Toxicological Reviews*, 24: 93-106.
- BRADFORD, H.F., WARD, H.K., THANKI, C.M. (1983). Glutamine as neurotransmitter precursor: complementary studies in vivo and in vitro of the synthesis and release of transmitter glutamate and GABA. In: L. Hertz, E. Kvamme, E.G. McGeer and A. Schousboe, Editors, Glutamine, Glutamate and GABA in the Central Nervous Sytem, Alan R Liss, New York (1983), pp. 249-260.

- BRAESTRUP, C., SCHMIENCHEN, R., NEEF, G., NIELSEN, M., PETERSEN, E.N. (1982). Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. *Science*, 216: 1241-1243.
- BRAESTRUP, C., SQUIRES, R.F. (1977). Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high affinity [³H]diazepam binding., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 1839-1847.
- BRECKENRIDGE, C.B., HOLDEN, L., STURGESE, N., WEINER, M., SHEETS, L., SARGENT, D., SODERLUND, D.M., CHOI, J., SYMINGTON, S., CLARK, J.M., BURR, S., RAY, D. (2009). Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology*, 30 Suppl 1: S17-31.
- BRODIE, M.E., ALDRIDGE, W.N. (1982). Elevated cerebellar cyclic GMP levels during the deltamethrin-induced motor syndrome. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*, 4: 109-113.
- BRODIE, M.E., OPACKA, J. (1987). Dissociation between circling behavior and striatal dopamine activity following unilateral deltamethrin administration of rats. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 331: 341-346.
- BROOKS, M.W., CLARK, J.M. (1987). Enhancement of norepinephrine release from rat brain synaptosomes by alpha cyano pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 28: 127-139.
- BURR, S.E., RAY, D.E. (2004). Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. *Toxicological Sciences*, 77: 341-346.
- BUSVINE, J.R. (1951). Mechanism of resistance to insecticides in housefly. *Nature*, 168: 193-195.
- CAGEN, S.Z., MALLEY, L.A., PARKER, C.M., GARDINER, T.H., VAN GELDER, G.A., JUD, V.A. (1984). Pyrethroid-mediated skin sensory stimulation characterized by a new behavioral paradigm. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 76: 270-279.
- CALABRESI, P., CENTONZE, D., GUBELLINI, P., MARFIA, G.A., PISANI, A., SANCESARIO, G., BERNARDI, G. (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 61: 231-265.
- CAO, G.M. & HOSHINO, T. (1998). Stability of catecholamines, indolamines and related metabolites in the process of sample preparation with ultrasonication and an analysis by high-performance liquid chromatography. *Analytical Sciences* 14: 835-838.
- CAO, Z., SHAFER, T.J., MURRAY, T.F. (2011). Mechanisms of pyrethroid insecticide-induced stimulation of calcium influx into neocortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 336: 197-205.
- CARAVACA RODRÍGUEZ, F.P., CASTEL GENÍS, J.M., GUZMÁN GUERRERO, J.L., DELGADO PERTÍÑEZ, M., MENA GUERRERO, Y., ALCALDE ALDEA, M.J., GONZÁLEZ REDONDO, P. (2005). Bases de la producción animal. Universidad de Sevilla. Serie: Manuales universitarios. Núm.: 61, 81-87.

- CARDINALI, D.P. (2007). Neurociencia aplicada. Sus fundamentos. *Editorial Médica Panamericana (Buenos Aires)*, 400-403.
- CARVALHO, C., CORREIA, S.C., CARDOSO, S., PLÁCIDO, A.I., CANDEIAS, E., DUARTE, A.I., MOREIRA, P.I. (2015). The role of mitochondrial disturbances in Alzheimer, Parkinson and Huntington diseases. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 19: 1-18.
- CATTERALL, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, 26 (1): 13-25.
- CATTERALL, W. A., CHANDY, K. G., CLAPHAM, D. E., GUTMAN, G. A., HOFMANN, F., HARMAR, A. J., ABERNETHY, D. R., SPEDDING, M. (2003). International Union of Pharmacology: Approaches to the Nomenclature of Voltage-Gated Ion Channels. *Pharmacological Review*, 55: 573-574.
- CATTERALL, W.A., GOLDIN, A.L., WAXMAN, S.G. (2005a). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, 57: 397-409.
- CATTERALL, W.A., PEREZ-REYES, E., SNUTCH, T.P., STRIESSNIG, J. (2005b). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological Reviews*, 57: 411-425.
- CHAMBERLAIN, K., MATSUO, N., KANEKO, H. & KHAMBAY, B.P.S. (1998). Pyrethroids. In "Chirality in Agrochemicals". (Eds. N. Kurihara & J. Miyamoto). John Wiley & Sons, Chichester: 9-84.
- CHANG, W.K., YANG, K.D., CHUANG, H., JAN, J.T., SHAIQ, M.F. (2002). Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels, *Clinical Immunology*, 104: 151.
- CHINTA, S.J., ANDERSEN, J.K. (2005). Dopaminergic neurons. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 37: 942-946.
- CHOI, J.S., SODERLUND, D.M. (2006). Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 211: 233-244.
- CLARK, J.M. (1995). Effects and mechanisms of action of pyrethrin and pyrethroid insecticides. In "Handbook of Neurotoxicology" (L.W. Chang and R.S. Dyers, eds.). *Marcel Dekker, Inc., New York*: 511-546.
- CLARK, J.M., BROOKS, M.W. (1989a). Neurotoxicology of pyrethroids: single or multiple mechanisms of action? *J. Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 361-372.
- CLARK, J.M., BROOKS, M.W. (1989b). Role of ion channels and intraterminal calcium homeostasis in the action of deltamethrin at presynaptic nerve terminals. *Biochemical Pharmacology*, 38: 2233-2245.

- COLADO, M.I., ORMAZABAL, M.J., ALFARO, M.J. & MARTIN, M.I. (1993). Effect of Bay K 8644 on the synthesis and metabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine in various brain areas of the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45: 220-222.
- CONJARD, A., BRUN, V., MARTIN, M., BAVEREL, G., FERRIER, B. (2002). Effect of starvation on glutamine ammoniogenesis and gluconeogenesis in isolated mouse kidney tubules. *Biochemical Journal*, 368: 301-308.
- CONNORS, B.W., MALENKA, R.C., SILVA, L.R. (1988). Two inhibitory postsynaptic potentials, and GABAA and GABAB receptor-mediated responses in neocortex of rat and cat. *Journal of Physiology*, 406: 443-468.
- CONRAD, L.C., PFAFF, D.W. (1976). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*, 169: 221-226.
- CONTI, F., MINELLI, A., MELONE, M. (2004). GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. *Brain Research Reviews*, 45: 196-212.
- COOPER, A.J., JEITNER, T.M. (2016). Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*, 6, 16; doi:10.3390/biom6020016.
- COOPER, J.R., BLOOM, F.E., ROTH, R.H. (1996). The biochemical basis of neuropharmacology, 7th ed., Oxford University Press, New Cork.
- CREMER, J.E. CUNNINGHAM, V.J., SEVILLE, M.P. (1983). Relationships between extraction and metabolism of glucose, blood flow, and tissue blood volume in regions of rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 3: 291-302.
- CROFTON, K.M., REITER, L.W. (1984). Effects of two pyrethroid insecticides on motor activity and acoustic startle response in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 75: 318-328.
- CROFTON, K.M., REITER, L.W. (1988a). Pyrethroid insecticides and the gamma-aminobutyric acid receptor complex. Motor activity and acoustic startle response in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 243: 946-954.
- CROFTON, K.M., REITER, L.W. (1988b). The effects of Type I and Type II pyrethroids on motor activity and acoustic startle response in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 10: 624-634.
- CSERNANSKY, J.G., BARDGETT, M.E., SHELIN, Y.I., MORRIS, J.C., OLNEY, J.W. (1996). CSF excitatory amino acids and severity of illness in Alzheimer's disease. *Neurology*, 46: 1715-1720.
- CUK, M., CUK, D., DVORNIK, S., MAMULA, O., MANESTAR, M.M. (2004). Recent findings regarding physiological characteristics and effects of renal dopamine. *Lijec. Vjesn*, 126: 147-155.
- CULLIFORD, S.J., BORG, J.J., O'BRIEN, M.J., KOZLOWSKI, R.Z. (2004). Differential effects of pyrethroids on volume-sensitive anion and organic osmolyte pathways. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31: 134-144.

- CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T.C., PIRES DE MELO, M., GARCIA, C., HOMEM DE BITTENCOURT Jr, P.I., GUIMARAES, A.R. (1999). Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 32: 15-21.
- CURI, R., LAGRANHA, C.J., DOI, S.Q., SELLITTI, D.F., PROCOPIO, J., PITHON-CURI, T.C., CORLESS, M., NEWSHOLME, P. (2005). Molecular mechanisms of glutamine action. *Journal of Cellular Physiology*, 204: 392-401.
- CYCON, M., PIOTROWSKA-SEGET, Z. (2016). Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: a review. *Frontiers in Microbiology*. Sep 15;7:1463. eCollection 2016.
- D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X., PASCUAL, A., LÓPEZ-BARNEO, J. (2015). GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13: 9-10.
- D'ANIELLO, A., DI COSMO, A., DI CRISTO, C., ANNUNZIATO, L., PETRUCELLI, L., FISHER, G. (1996). Involvement of D-aspartic acid in the synthesis of testosterone in rat testes. *Life Sciences*, 59: 97-104.
- D'ANIELLO, A., DI FIORE, M. M., FISHER, G.H., MILONE, A., SELENI, A., D'ANIELLO, S., PERNA, A.F., INGROSSO, D. (2000). Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *FASEB Journal*, 14: 699-714.
- DANBOLT, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65: 1-105.
- DARMAUN, D., MATTHEWS, D.E., BIER, D.M. (1986). Glutamine and glutamate kinetics in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 251: 117-126.
- DAS, R., STEEGE, A., BARON, S., BECKMAN, J., HARRISON, R. (2001). Pesticide-related illness among migrant farm workers in the United States. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 7: 303-312.
- DAVIDSON, R. J., JACKSON, D. C., KALIN, N. H. (2000). Emotion, plasticity, contest, and regulation: perspectives from affective neuroscience. *Psychological Bulletin*, 126: 890-909.
- DAVIES, T.E., O'REILLY, A.O., FIELD, L.M., WALLACE, B., WILLIAMSON, M.S. (2008). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids: from target-site mutations to molecular modelling. *Pest Management Science*, 64:1126–1130.
- DAVIES, T.G., FIELD, L.M., USHERWOOD, P.N., WILLIAMSON, M.S. (2007). A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology*, 16(3): 361-375.

- DAYAL, M., PARMAR, D., DHAWAN, A., ALI, M., DWIVEDI, U.N., SETH, P.K. (2003). Effect of pretreatment of cytochrome P450 (P450) modifiers in neurobehavioral toxicity induced by deltamethrin. *Food and Chemical Toxicology*, 41: 431-437.
- DE BRUYN, D., VAN AKEN, E., HERMAN, K. (2017). A rare case of concomitant sicca keratopathy and ipsilateral central facial palsy in Wallenberg's dorsolateral medullary syndrome. *GMS Ophthalmology Cases*, Mar 7;7: Doc08. eCollection 2017.
- DE LAU, L. M. L., BRETELER, M. M. B. (2006). Epidemiology of Parkinson disease. *Lancet Neurology*, 5: 525-535.
- DE SOUZA, H.M., BORBA-MURAD, G.R., CEDDIA, R.B., CURI, R., VARDANEGA-PEICHER, M., BAZOTTE, R.B. (2001). Rat liver responsiveness to gluconeogenic substrates during insulin-induced hypoglycemia. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 34: 771-777.
- DERE, E., HUSTON, J.P., DE SOUZA SILVA, M.A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(5): 673-704.
- DEVAUD, L.L., MURRAY, T.F. (1986). PK11195 antagonism of pyrethroid-induced proconvulsant activity. *European Journal of Pharmacology*, 120: 269-273.
- DEVAUD, L.L., MURRAY, T.F. (1988). Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the proconvulsant actions of pyrethroid insecticides. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 247: 14-22.
- DOHERTY, J.D., LAUTER, C.J., SALEM, N.Jr. (1986b). Synaptic effects of the synthetic pyrethroid resmethrin in rat brain in vitro. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 84(2):373-9.
- DOHERTY, J.D. NISHIMURAA, K., KURIHARA, N., FUJITA, T. (1987). Promotion of norepinephrine released and inhibition of calcium uptake by pyrethroids in rat brain synaptosomes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29(3): 187-196.
- DOHERTY, J.D., MORII, N., HIROMOR, IT., OHNISHI, J. (1988). Pyrethroids and the striatal dopaminergic system in vivo. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 91C: 371-375.
- DORMAN, D.C., BRENNEMAN, K.A., BOLON, B. (2002). Nervous system. In: Handbook of Toxicologic Pathology. 2nd edition. Volume 2. Haschek, W.M., Rousseaux, G.C. & Wallig, M.A. (Eds), Academic Press, California: 509-537.
- DUVILANSKI, B.H., SELGAS, L., GARCÍA-BONACHO, M., ESQUIFINO, A.I. (1998). Daily variations of amino acid concentration in mediobasal hypothalamus, in rats injected with Freud's adjuvant. Effect of cyclosporine. *Journal of Neuroimmunology*, 87: 189-196.
- EBRAHIM, A.S., SAKTHISEKARAN, D. (1997). Effect of vitamin E and taurine treatment on lipid peroxidation and antioxidant defense in perchloroethylene-induced cytotoxicity in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 8: 270-274.

EELLS, J.T., DUBOCOVICH, M.L. (1988). Pyrethroid insecticides evoke neurotransmitter release from rabbit striatal slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246: 514-521.

EFSA (European Food Safety Authority). (2009). Scientific Opinion of the Panel on Plant Protection Products and their residues (PPR) on a request from the European Commission on potential developmental neurotoxicity of deltamethrin (Question No EFSA-Q-2008-373). *The EFSA Journal*, 921: 1-34.

EL-DEMERDASH, F.M. (2007). Lamda-cyhalothrin-induced changes in oxidative stress biomarkers in rabbit erythrocytes and alleviation effect of some antioxidants. *Toxicology in vitro*, 21:392-397.

EL-DEMERDASH, F.M., YOUSEF, M.I., AL-SALHEN, K.S. (2003). Protective effects of isoflavone on some biochemical parameters affected by cypermethrin in male rabbits. *Journal of Environmental Science and Health*, B38: 365-378.

EL ISIDRI A., SHEN C.H., L'AMOREAUX W.J. (2013). Neuroprotective role of taurine during aging. *Amino acids*, 45: 735-750.

ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H., PEARSON, B.C. (1967). 5-Benzyl-3-furylmethyl chrysanthemate a new potent insecticide. *Nature (London)*, 213: 493-494.

ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H., PULMAN, D.A. (1974a). Synthetic insecticide with a new order of activity. *Nature (London)*, 248: 710-711.

ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., NEEDHAM, P.H., PULMAN, D.A. (1974b). Insecticidally active conformations of pyrethroids. In "Kohn, G.K. (Ed.), Mechanism of Pesticide Action". *American Chemical Society, Washington, DC*: 80–91.

ELLIOT, M., FARNHAM, A.W., JANES, N.F., SODERLUND, D.M. (1978). Insecticidal activity of the pyrethrins and related compounds. Part XI. Relative potencies of isomeric cyano-substituted 3-pehnoxybenzyl esters. *Pesticide. Science*, 9: 112–116.

ELLIOT, M. (1995). Chemicals in insect control. In "Pyrethrum flowers: Production, Chemistry, Toxicology, and Uses" (J.E. Casida and G.B. Quistad, eds.). *Oxford University Press, New York*: 3-31.

EMA (European Medicines Agency) (2004). Committee for medical products for veterinary use. Deltamethrin (extrapolation to all ruminants). *Summary report. EMA/MRL/893/03-Final*, June 2004.

EUROPEAN COMMISSION (2002). Review report for the active substance deltamethrin (6504/VI/99-final). Standing Committee on the Food Chain and Animal Health, Health & Consumers Protection Directorate-General.

FEINSTEIN, D.L., KALININ, S., BRAUN, D. (2016). Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system. *Journal of Neurochemistry*, 139(2):154-178.

- FERNÁNDEZ, M.C., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., DÍAZ, M.J., FERNÁNDEZ-CRUZ, M.L., BRINGAS, P., MARTÍNEZ, M.A., ANADÓN, A (1995). Efecto del piretroide deltametrina sobre los niveles de monoaminas en diferentes regiones del encéfalo de rata. *Revista de Toxicología*, 12: 20-23.
- FLANNIGAN, S.A., TUCKER, S.B. (1985). Variation in cutaneous sensation between synthetic pyrethroid insecticides. *Contact dermatitis*, 13: 140-147.
- FON, E.A., EDWARDS, R.H. (2001). Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve*, 24: 581-601.
- FORNAL, C.A., LITTO, W.J., METZLER, C.W., MARROSU, F., TADA, K., JACOBS, B.L. (1994). Single-unit responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT1A agonist and antagonist drug administration in behaving cats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270: 1345-1358.
- FORRAY, M.I., GYSLING, K. (2004). Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 47: 145-160.
- FORSHAW, P.J., LISTER, T., RAY, D.E. (1987). The effects of two types of pyrethroid on rat skeletal muscle. *European Journal of Pharmacology*, 134: 89-96.
- FORSHAW, P.J., LISTER, T., RAY, D.E. (1993). Inhibition of a neuronal voltage-dependent chloride channel by the Type II pyrethroid deltamethrin. *Neuropharmacology*, 32: 105-111.
- FORSHAW, P.J., LISTER, T., RAY, D.E. (2000). The role of voltage-gated chloride channels in type II pyrethroid insecticide poisoning. *Toxicology and applied Pharmacology*, 163: 1-8.
- FORSHAW, P.J., RAY, D.E. (1990). A novel action of deltamethrin on membrane resistance in mammalian skeletal muscle and non-myelinated nerve fibers. *Neuropharmacology*, 29: 75-81.
- FOWLER, C.J. & TIPTON, K.F. (1984). On the substrate specificities of the two forms of monoamine oxidase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 36(2): 111-115.
- FOX, M.E., WIGHTMAN, R.M. (2017). Contrasting regulation of catecholamine neurotransmission in the behaving brain: pharmacological insights from an electrochemical perspective. *Pharmacological Reviews*, 69: 12-32.
- FROGER N., JAMMOUL F., GAUCHER D., CADETTI L., LORACH H., DEGARDIN J., PAIN D., DUBUS E., FORSTER V., IVKOVIC I., SIMONUTTI M., SAHEL J.A., PICAUD S. (2013). Taurine is a crucial factor to preserve retinal ganglion cell survival. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 775: 69-83.
- FUCHS, B.C., BODE, B.P. (2006). Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. *Journal of Surgical Research*, 131: 26-40.
- GAMMON, D.W., BROWN, M.A., CASIDA, J.E. (1981). Two classes of pyrethroid action in the cockroach. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 15: 181-191.

- GAZZOLA, G.C., DALL'ASTA, V., NUCCI, F.A., ROSSI, P.A., BUSSOLATI, O., HOFFMANN, E.K., GUIDOTTI, G.G. (1991). Role of amino acid transport system A in the control of cell volume in cultured human fibroblasts. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 1: 131-142.
- GELBAND, C.H., GRECO, P.J., MARTENS, J.R. (1996). Voltage-dependent chloride channels: from invertebrates to man. *The Journal of Experimental Zoology*, 175: 277-282.
- GILBERT, M.E., ACHESON, S.K., MACK, C.M., CROFTON, K.M. (1990). An examination of the proconvulsant actions of pyrethroid insecticides using pentylenetetrazol and amygdala kindling seizure models. *Neurotoxicology*, 11: 73-86.
- GINSBURG, K.S., NARAHASHI, T. (1993). Differential sensitivity of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels to the insecticide allethrin in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 627: 239-248.
- GIRAY, B., GURBAY, A., HINCAL, F. (2001). Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters*, 118: 139-146.
- GLOWA, J.R. (1986). Acute and sub-acute effects of deltamethrin and chlordimeform on schedule-controlled responding in the mouse. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 8: 97-102.
- GLOWINSKI, J. & IVERSEN, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain – I. The disposition of [3 H] norepinephrine, [3 H] dopamine and [3 H] DOPA in various regions of the brain. *Journal of Neurochemistry*, 13: 655-669.
- GOLDIN, A.L. (1999). A diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 88: 38-50.
- GOLDIN, A.L. (2001). Resurgence of sodium channels research. *Annual Review of Physiology*, 63: 871-894.
- GOLDIN, A.L. (2003). Mechanisms of sodium channel inactivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 13 (3): 284-290.
- GRAS, C., HERZOG, E., BELLENCHI, G.C., BERNARD, V., RAVASSARD, P., POHL, M., GASNIER, B., GIROS, B., EL MESTIKAWY, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *Journal of Neuroscience*, 22: 5442-5451.
- GREEN, T. R., FELLMAN, J. H., EICHER, A. L., PRATT, K. L. (1991). Antioxidant role and subcellular location of hypotaurine and taurine in human neutrophils. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1073: 91-97.
- GREENE, J.G., GREENAMYRE, J.T. (1996). Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Progress in Neurobiology*, 48: 613-634.
- GUILLEM, A.M., MARTÍNEZ-LOZADA, Z., HERNÁNDEZ-KELLY, L.C., LÓPEZ-BAYGHEN, E., LÓPEZ-BAYGHEN, B., CALLEROS, O.A., CAMPUZANO, M.R., ORTEGA, A. (2015). Methylphenidate increases glutamate uptake in Bergmann Glial cells. *Neurochemical Research*, doi 10.1007/s11064-015-1721-z.

- GULPINAR, M.A., YEGEN, B.C. (2004). The physiology of learning and memory: role of peptides and stress. *Curr. Protein. Pept. Sci.*, 5: 457-473.
- GÜNDÜZ, E., ÜLGER, B.V., İBİLOĞLU, I., EKINCI, A., DURSUN, R., ZENGİN, Y., İÇER, M., USLUKAYA, Ö., EKINCI, C., GÜLOĞLU, C. (2015). Glutamine provides effective protection against deltamethrin-induced acute hepatotoxicity in rats but not against nephrotoxicity. *Medical Science Monitor*, 21:1107-1114.
- GUSTAFSON, I., WESTERBERG, E., WIELOCH, T. (1990). Protection against ischemia-induced neuronal damage by the alpha 2-adrenoceptor antagonist idazoxan: influence of time of administration and possible mechanisms of action. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 10(6): 885-94.
- HAGIWARA, N., IRISAWA, H., KAMEYAMA, M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemakers potentials of rabbit sino-atrial node cells. *Journal of Physiology*, 395: 233-253.
- HALFORD, J.C., HARROLD, J.A., LAWTON, C.L., BLUNDELL, J.E. (2005). Serotonin (5-HT) drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Current Drug Targets*, 6: 201-213.
- HE, F., WANG, S., LIU, L., CHEN, S., ZHANG, Z., SUN, J. (1989). Clinical manifestations and diagnosis of acute pyrethroid poisoning. *Archives of toxicology*, 63: 54-58.
- HEMAN, P., BARCIA, C., GÓMEZ, A., ROS, C.M., ROS-BERNAL, F., YUSTE, J.E., DE PABLOS, V., FERNÁNDEZ-VILLALBA, E., TOLEDO-CÁRDENAS, M.R., HERRERO, M.T. (2012). Nigral degeneration correlates with persistent activation of cerebellar Purkinje cells in MPTP-treated monkeys. *Histology and histopathology*, 27: 89-94.
- HEMINGWAY, J., RANSON, H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, 45: 371-391.
- HERTZ, L. (2006). Glutamate, a neurotransmitter—And so much more A synopsis of Wierzba III. *Neurochemistry International*, 48: 416-425.
- HIJZEN, T.H., DE BEUN, R., SLANGEN, J.L. (1988). Effects of pyrethroids on the acoustic startle reflex in the rat. *Toxicology*. 49(2-3):271-276.
- HILDEBRAND, M.E., MCRORY, J.E., SNUTCH, T.P., STEA, A. (2004). Mammalian voltage-gated calcium channels are potently blocked by the pyrethroid insecticide allethrin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 308(3): 805
- HIKOSAKA, O., TAKIKAWA, Y., KAWAGOE, R. (2000). Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological Reviews*, 80: 953–978.
- HOFFMAN, B.B., LEFKOWITZ, R.J., TAYLOR, P. (1996). Neurotransmission: the autonomic and somatic motor nervous system. In: Goodman & Gillman's the pharmacological basis of therapeutics (Hardman JG, Limbird LE eds.), 9th ed., McGraw-Hill, New York: 105-139.

- HOLMES, R. P., GOODMAN, H. O., SHIHABI, Z. K., JAROW, J. P. (1992). The taurine and hypotaaurine content of human semen. *Journal of Andrology*, 13: 289-292.
- HOLLERMAN, J. R., TREMBLAY, L., SCHULTZ, W. (2000). Involvement of basal ganglia and orbitofrontal cortex in goal-directed behavior. *Progress in Brain Research*, 126: 193-215.
- HORIG, H., SPAGNOLI, G.C., FILGUEIRA, L., BABST, R., GALLATI, H., HARDER, F., JURETIC, A., HEBERER, M. (1993). Exogenous glutamine requirement is confined to late events of T cell activation, *Journal of Cellular Biochemistry*, 53: 343-351.
- HOSSAIN, M.M., SUZUKI, T., RICHARDSON, J.R., KOBAYASHI, H. (2013). Acute Effects of Pyrethroids on Serotonin Release in the Striatum of Awake Rats: An In Vivo Microdialysis Study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27(2): 150-156.
- HOSIE, A.M., BAYLIS, H.A., BUCKINGHAM, S.D., SATTELLE, D.B. (1995). Actions of the insecticide fipronil, on dieldrin-sensitive and -resistant GABA receptors of *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology*, 115: 909-912.
- HOYER, D., CLARKE, D.E., FOZARD, J.R., HARTIG, P.R., MARTIN, G.R., MYLECHARANE, E.J., SAXENA, P.R., HUMPHREY, P.P. (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*, 46: 157-203.
- HUDSON, P.M., TILSON, H.A., CHEN, P.H., HONG, J.S. (1986). Neurobehavioral effects of permethrin are associated with alterations in regional levels of biogenic amine metabolites and amino acid neurotransmitters. *Neurotoxicology*, 7: 143-154.
- HUGHES, T.A., WILES, C.M. (1998). Neurogenic dysphagia: the role of the neurologist. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 64(5):569-572.
- HUSAIN, R., ADHAMI, V.M., SETH, P.K. (1996). Behavioral, neurochemical, and neuromorphological effects of deltamethrin in adult rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 48: 515-526.
- INOUE, S.T., KAWAMURA, H. (1979). Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 76: 5962-5966.
- JAN, L.Y., JAN, Y.N. Tracing the roots of ion channels. *Cell*, 69 (5): 715-718.
- JENTSCH, T.J. (1996). Chloride channels: a molecular perspective. *Current opinion in neurobiology*, 6: 303-310.
- JENTSCH, T.J., FRIEDRICH, T., SCHRIEVER, A., YAMADA, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflügers Archiv*, 437: 783-795.
- JENTSCH, T.J., STEIN, V.F.W., ZDEBIK, A.A. (2001). Molecular structure and physiological function of chloride. *Physiological Reviews*, 82: 503-568.
- JINNO S. (2016). Aging affects new cell production in the adult hippocampus: A quantitative anatomic review. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 76(Pt B):64-72.

- JOHNSTON, G.A.R. (1996). GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 69: 173-198.
- JONKERS, N., SARRE, S., EBINGER, G., MICHOTTE, Y. (2002). MK801 suppresses the L-DOPA-induced increase of glutamate in striatum of hemi-Parkinson rats. *Brain Research*, 926: 149-155.
- JOSE, P.A., EISNER, G.M., FELDER, R.A. (2003). Regulation of blood pressure by dopamine receptors. *Nephron Physiol.*, 95: 19-27.
- JOY, R.M., ALBERTSON, T.E. (1991). Interactions of GABAA antagonists with deltamethrin, diazepam, pentobarbital, and SKF100330A in the rat dentat gyrus. *Toxicology and applied Pharmacology*, 109(2): 251-262.
- JOY, R.M., ALBERTSON, T.E., RAY, D.E. (1989). Type I and Type II pyrethroids increase inhibition in the hippocampal dentate gyrus of the rat. *Toxicology and applied Pharmacology*, 98(3): 398-412.
- JOY, R.M., (1990). Characteristics of the prolonged inhibition produced by a range of pyrethroids in the rat hippocampus. *Toxicology and applied Pharmacology*, 103(3): 528-538.
- KANG, Y.M., CHEN, J.Y., OUYANG, W., QIAO, J.T. (2002). Serotonin excites arcuate neurons directly but inhibits them through intercalated GABAergic neurons. *Sheng Li Xue Bao*, 54: 189-195.
- KHADRAWY, Y.A., MOURAD, I.M., MOHAMMED, H.S., NOOR, N.A., ABOUL EZZ, H.S. (2017). Cerebellar neurochemical and histopathological changes in rat model of Parkinson's disease induced by intrastriatal injection of rotenone. *General Physiology and Biophysics*, 36(1):99-108.
- KHOGALI, S.E., PRINGLE, S.D., WERYK, B.V., RENNIE, M.J. (2002). Is glutamine beneficial in ischemic heart disease? *Nutrition*, 18: 123-126.
- KIM H.Y., KIM H.V., YOON J.H., KANG B.R., CHO S.M., LEE S., KIM J.Y., KIM J.W., CHO Y, WOO J., KIM Y. (2014). Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 4:7467.
- KIM, K-B, ANAND, S.S., KIM, H.J., WHITE, C.A., BRUCKNER, J.V. (2008). Toxicokinetics and tissue distribution of deltamethrin in adult Sprague-Dawley rats. *Toxicological Sciences*, 101(2): 197-205.
- KIRBY, M.L., CASTAGNOLI, K., BLOOMQUIST, J.R. (1999). In vivo effectos od deltamethrin on dopamine neurochemistry and the role of augmented neurotransmitter release. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 65: 160-168.
- KISSINGER, P.T., REFSHAUGE, C., DREILING, R. & ADAMS, R.N. (1973). An electrochemical detector for liquid chromatography with pictogram sensivity. *Analytical Letters*, 6: 465-477.
- KITAZAWA, M., WAGNER, J.R., KIRBY, M.L., ANANTHARAM, V., KANTHASAMY, A.G. (2002). Oxidative Stress and Mitochondrial-Mediated

Apoptosis in Dopaminergic Cells Exposed to Methylcyclopentadienyl Manganese Tricarbonyl. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 302:26–35.

KLEINE, B.U., PRAAMSTRA, P., STEGEMAN, D.F., ZWARTS, M. (2001). Impaired motor cortical inhibition in Parkinson's disease: motor unit responses to transcranial magnetic stimulation. *Experimental Brain Research*, 138: 477-483.

KOWALCHUK, J.M., CURI, R., NEWSHOLME, E.A. (1988). Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. *Biochemical Journal*, 249: 705-708.

LABOW, B.I., SOUBA, W.W. (2000). Glutamine. *World Journal of Surgery*, 24: 1503-1513.

LABOW, B.I., SOUBA, W.W., ABCOUWER, S.F. (2001). Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism—glutaminase and glutamine synthetase. *Journal of Nutrition*, 131: 2486-2487.

LAFORGE, F.B., HALLER, H.L. (1936), Constituents of pyrethrum flowers. VI. The structure of pyrethrolone. *Journal of the American Chemical Society*, 58: 1777:1780.

LAFUENTE, A., MÁRQUEZ, N., PAZO, D., ESQUIFINO, A.I. (2001). Cadmium effects on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *Biometals*, 13: 47-55.

LAMBARDINI, J.B. (1985). Effects of taurine on calcium ion uptake and protein phosphorylation in rat retinal membrane preparations, *Journal of Neurochemistry*, 45: 268-275.

LAWRENCE, L.J., CASIDA, J.E. (1983). Stereospecific action of pyrethroid insecticides on the γ -aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Science*, 221: 1399-1401.

LAWRENCE, L.J., CASIDA, J.E. (1982). Pyrethroid toxicology. Mouse intracerebral structure-toxicity relationship. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18: 9-14.

LAWRENCE, L.J., GEE, K.W., YAMAMURA, H.I. (1985). Interactions of pyrethroid insecticides with chloride ionophore-associated binding sites. *Neurotoxicology*, 6(2): 87-98.

LEE, S.H., YOON, K.S., WILLIAMSON, M.S., GOODSON, S.J., TAKANO-LEE, M., EDMAN, J.D., DEVONSHIRE, A.L., CLARK, J.M. (2000). Molecular analysis of kdr-like resistance in permethrin-resistant strains of head lice, *Pediculus capitis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 66: 130-143.

LEE, S.H., SODERLUND, D.M. (2001). The V410M mutation associated with pyrethroid resistance in *Heliothis virescens* reduces the pyrethroid sensitivity of housefly sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 19-29.

LEEB-LUNDBERG, F., OLSEN, R.W. (1980). Picrotoxinin binding as a probe of the GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. In "Psychopharmacology and Biochemistry of Neurotransmitter Receptors" (H.I. Yamamura et al., eds.). *Elsevier, New York*: 593-606.

- LEHMANN, K., STEINECKE, A., BOLZ, J. (2012). GABA through the ages: regulation of cortical function and plasticity by inhibitory interneurons. *Neural Plasticity Volume 2012*, Article ID 892784, 11 pages.
- LEVINE, H. 3rd. (1999). Structural features of heterotrimeric G-protein-coupled receptors and their modulatory proteins. *Molecular Neurobiology*, 19: 111-149.
- LIMA L. CUBILLOS, S. (1998). Taurine might be acting as a trophic factor in the retina by modulating phosphorylation of cellular proteins, *Journal of Neuroscience Research*, 53: 377-384.
- LIU, G.P. AND SHI, N. (2006). The inhibitory effects of deltamethrin on dopamine biosynthesis in rat PC12 cells. *Toxicology Letters*, 161: 195-199.
- LIU, G.P., MA, Q., SHI, N. (2006). Tyrosine hydroxylase as a target for deltamethrin in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *Biomedical and Environmental Sciences*, 19: 27-34.
- LIU J., LIU Y., WANG X.F., CHEN H., YANG N. (2013). Antenatal taurine supplementation improves cerebral neurogenesis in fetal rats with intrauterine growth restriction through the PKA-CREB signal pathway. *Nutritional Neuroscience*, 16(6): 282-287.
- LOCK, E.A., BERRY, P.N. (1981). Biochemical changes in the rat cerebellum following cypermethrin administration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 59: 508-514.
- LÓPEZ-BARNEO, J. (2012). Neuroprotección y terapia celular en la enfermedad Parkinson. V Jornadas de Divulgación de la Investigación en Biología Molecular, Celular, Genética y Biotecnología (Universidad de Córdoba). *Digital.CSIC, ciencia en abierto*. http://digital.csic.es/bitstream/10261/50039/2/Neuroproteccion_IMA.pdf
- LORIGADOS, L., OROZCO, S., MORALES, L., ESTUPIÑÁN, B., GARCÍA, I., ROCHA, L. (2013). Excitotoxicidad y muerte neuronal en la epilepsia. *Biotecnología Aplicada*, 30:1-8.
- LOTHARIUS, J. & O'MALLEY, K.L. (2000). The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49): 38581-38588.
- LUJÁN, R. (2004). Bases moleculares de la señalización neuronal. *Ciencia al Día Internacional*, 2.
- LUND, A.E., NARAHASHI, T. (1983). Kinetics of sodium channel modification as the basis for the variation in the nerve membrane effects of pyrethroids and DDT analogs. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 20: 203-216.
- MACDONALD, R.L., OLSEN, R.W. (1994). GABA_A receptor channels. *Annual Review of Neuroscience*, 17: 569-602.
- MADRIGAL J. L., FEINSTEIN D. L., DELLO R. C. (2005) Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death. *Journal of Neuroscience Research*, 81: 390–396.

- MADRIGAL J. L., KALININ S., RICHARDSON J. C., FEINSTEIN D. L. (2007) Neuroprotective actions of noradrenaline: effects on glutathione synthesis and activation of peroxisome proliferator activated receptor delta. *Journal of Neurochemistry*, 103: 2092–2101.
- MARAZZITI, D. (2017). Understanding the role of serotonin in psychiatric diseases. *F1000 Research*, 6: 180.
- MARCZYNSKI, T.J. (1998). GABAergic deafferentation hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease revisited. *Brain Research Bulletin*, 45(4):341-379.
- MARTEL, J., CHOPIN, P., COLPAERT, F., MARIEN, M. (1998). Neuroprotective effects of the alpha2-adrenoceptor antagonists, (+)-efaroxan and (+/-)-idazoxan, against quinolinic acid-induced lesions of the rat striatum. *Experimental Neurology*, 154: 595-601.
- MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A., MARTÍNEZ, M.A., MARTÍNEZ MARTA, CASTELLANO, V.J., DÍAZ, M.J. (2003). 5-HT loss in rat brain by type II pyrethroid insecticides. *Toxicology and Industrial Health*, 19: 147-155.
- MATES, J.M., PEREZ-GOMEZ, C., NUÑEZ DE CASTRO, I., ASENJO, M., MARQUEZ, J. (2002). Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34: 439-458.
- MEACHAN, C.A., BRODFUEHRER, P.D., WATKINS, J.A., SHAFER, T.J. (2008). Developmentally-regulated sodium channel subunits are differentially sensitive to α -cyano containing pirethroids. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 231(3): 273-281.
- MEADOWS, L.S., ISOM, L.L. (2005). Sodium channels as macromolecular complexes: implications for inherited arrhythmia syndromes. *Cardiovascular Research*, 67: 448-458.
- MEELEY, M.P., UNDERWOOD, M.D., TALMAN, W.T., REIS, D.J. (1989). Content and in vitro release of endogenous amino acids in the area of the nucleus of the solitary tract of the rat. *Journal of Neurochemistry*, 53: 1807-1817.
- MEISER, J., DELCAMBRE, S., WEGNER, A., JÄGER, C., GHELFI, J., D'HEROUEL, A.F., DONG, X., WEINDL, D., STAUTNER, C., NONNENMACHER, Y., MICHELUCCI, A., POPP, O., GIESERT, F., SCHILDKNECHT, S., KRÄMER, L., SCHNEIDER, J.G., WOITALLA, D., WURST, W., SKUPIN, A., WEISENHORN, D.M., KRÜGER, R., LEIST, M., HILLER, K. (2016). Loss of DJ-1 impairs antioxidant response by altered glutamine and serine metabolism. *Neurobiology of Disease*, 89:112-125.
- MELIS, G.C., TER WENGEL, N., BOELEN, P.G., VAN LEEUWEN, P.A. (2004). Glutamine recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 7: 59-70.
- MICHAELIS, E.K. (1998). Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Progress in Neurobiology*, 54: 369-415.

MICHELS, L., MARTIN, E., KLAVER, P., EDDEN, R., ZELAYA, F., LYTHGOE, D.J., LUVHINGER, R., BRANDEIS, D., O'GORMAN, R.L. (2012). Frontal GABA levels change during working memory. *PLOS One* 7, e3193.

MILLAN, M.J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70: 83-244.

MILLER, G.W., KIRBY, M.L., LEVEY, A.I. & BLOOMQUIST, J.R. (1999). Heptachlor alters expression and function of dopamine transporters. *Neurotoxicology*, 20: 631-637.

MOGUILEVSKY, J.A., WUTTKE, W. (2001). Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109:188-195.

MOLCHANOVA, S.M., OJA, S.S., SARANSAARI, P. (2007). Effect of taurine on the concentrations of glutamate, GABA, glutamine and alanine in the rat striatum and hippocampus. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 50: 95-97.

MOORE, R.Y., SPEH, J.C. (2004). Serotonin innervation of the primate suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 1010: 169-173.

MORIN, S., WILLIAMSON, M.S., GOODSON, S.J., BROWN, J.K., TABASHNIK, B.E., DENNEHY, T.J. (2002). Mutations in the Bemisia tabaci para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1781-1791.

MORTON, S.M., BASTIAN, A.J. (2004) Cerebellar control of balance and locomotion. *Neuroscientist*, 10(3):247-59.

MURRAY, E., WISE, S., RHODES, S. (2011). What can different brains do with reward? *Neurobiology of Sensation and Reward*, ed J. Gottfried (Boca Raton, FL: CRC Press), 61–98.

NAEHER, L.P., TULVE, N.S., EGEGHY, P.P., BARR, D.B., ADETONA, O., FORTMANN, R.C., NEEDHAM, L.L., BOZEMAN, E., HILLIARD, A., SHELDON, L.S. (2010). Organophosphorus and pyrethroid insecticide urinary metabolite concentrations in young children living in a southeastern United States city. *Science of the Total Environment*, 408: 1145-1153.

NARAHASHI, T. (1992). Nerve membrane Na⁺ channels as targets of insecticides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13: 236-241.

NARAHASHI, T. (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacology and Toxicology*, 78: 1-14.

NEAL, R., COOPER, K., KELLOGG, G., GWER, H., ERCAL, N. (1999). Effect of some sulfur containing antioxidants on lead exposed lenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 26: 239-243.

NEWSHOLME, P., CURI, R., GORDON, S., NEWSHOLME, E.A. (1986). Metabolism of glucose, glutamine, longchain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochemical Journal*, 239: 121-125.

- NEWSHOLME, P., LIMA, M.M., PROCOPIO, J., PITHON-CURI, T.C., DOI, S.Q., BAZOTTE, R.B., CURI, R. (2003a). Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*, 36: 153-163.
- NEWSHOLME, P., PROCOPIO, J., LIMA, M.M., PITHON-CURI, T.C., CURI, R. (2003b). Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochemistry and Function*, 21: 1-9.
- NICHOLSON, R.A., WILSON, R.C., POTTER, C., BLACK, M.H. (1987). Pyrethroid- and DDT-evoked release of GABA from the nervous system in vitro. In “Pesticide Chemistry: Human Welfare and the Environment” (J. Miyamoto and P.C. Kearney, eds.). *Pergamon, Oxford*, Vol 3: 75-78.
- NING-NING CHEN, DAN-JU LUO, XIU-QING YAO, CONG YU, YI WANG QUN WANG, JIAN-ZHI WANG, GONG-PING LIU. (2012). Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats. *Journal of Alzheimer's Disease*, 30: 585-594.
- NIUWENHUYS, R., VOOGD, J., VAN HUIZEN, C. (2009). El sistema nervioso central humano - 4ª edición - *Editorial Médica Panamericana*, 289-336, 361-401.
- OGATA, N. VOGEL, S.M., NARAHASHI, T. (1988). Lindane but not deltamethrin blocks a component of GABA-activated chloride channels. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2(13): 2895-2900.
- OHNO, N., FUJIMOTO, K., OKUNO, Y., MIZUTANI, T., HIRANO, M., YOSHIOKA, H. (1974). A new class of pyrethroidal insecticides: α -substituted phenylacetic acid esters. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38: 881-883.
- OKAMOTO, K., KIMURA, H., SAKAI, Y. (1983). Taurine-induced increase of the Cl⁻-conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Research*, 259: 319-323.
- OOTSUKA, Y., BLESSING, W.W. (2006). Thermogenesis in brown adipose tissue: increase by 5-HT_{2A} receptor activation and decrease by 5-HT_{1A} receptor activation in conscious rats. *Neuroscience Letters*, 395: 170-174.
- O'REILLY, A.O., KHAMBAY, B.P.S., WILLIAMSON, M.S., FIELD, L.M., WALLACE, B.A., DAVIES, T.G.E. (2006). *Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel*. *Biochemical Journal*, 396: 255-263.
- OSTREA, E.M.Jr., BIELAWSKI, D.M., POECION, N.C.Jr., CORRION, M., VILLANEUVA-U y E, BERNARDO, R.C., JIN, Y., JANISSE, J.L., AGER, J.W. (2009). Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure of environmental pesticides. *Environmental Research*, 109: 116-122.
- OWENS, D.F., KRIEGSTEIN, A.R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nature Reviews Neuroscience*, 3: 715-727.
- PALKOVITS, M., ELEKES, I., LANG, T., PATTHY, A. (1986). Taurine levels in discrete brain nuclei of rats. *Journal of Neurochemistry*, 47: 1333-1335.

- PARK, J.H., PARK, Y.S., KOH, H.C. (2016). Progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons induced by inflammatory responses to fipronil. *Toxicology Letters*, 258: 36-45.
- PARK, Y., TAYLOR, M.F.J. (1997). A novel mutation L1029H in sodium channel gene hscp associated with pyrethroid resistance for *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27: 9-13.
- PAROXINOS, G. & WATSON, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th Edition, Academic Press, California.
- PAULA-LIMA, A.C., BRITO-MOREIRA, J., FERREIRA, S.T. (2013). Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 126: 191-202.
- PECCI, L., MONTEFOSCHI, G., FONTANA, M., DUPRÈ, S., COSTA, M., CAVALLINI, D. (2000). Hypotaurine and superoxide dismutase: Protection of enzyme against inactivation by hydrogen peroxide and peroxidation to taurine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 483: 163-168.
- PENG, Z.Y., HAMIEL, C.R., BANERJEE, A., WISCHMEYER, P.E., FRIESE, R.S., WISCHMEYER, P. (2006). Glutamine attenuation of cell death and inducible nitric oxide synthase expression following inflammatory cytokine-induced injury is dependent on heat shock factor-1 expression. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 30(5): 400-407.
- PETERS, J.A., MALONE, H.M., LAMBERT, J.J. (1992). Recent advances in the electrophysiological characterization of 5-HT₃ receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 13: 391-397.
- PETRONIN, I., P.G., URBANI, S., ALFIERI, R., BORGHETTI, A.F., GUIDOTTI, G.G. (1996). Cell susceptibility to apoptosis by glutamine deprivation and rescue Survival and apoptotic death in cultured lymphoma-leukemia cell lines. *Journal of Cellular Physiology*, 169: 175-185.
- PHAM, H.C., NAVARRO-DELMASURE, C., CLAVEL, P., VAN HAVERBEKE, G., CHEAV, S.L. (1984). Toxicological studies of deltamethrin. *International Journal of Tissue Reactions*, 6: 127-133.
- PICKETT, J.A. (2004) New opportunities in neuroscience, but a great danger that some may be lost. In: "Neurotox '03: Neurotoxicological Targets from Functional Genomics and Proteomics". (Editors D.J. Beadle, I.R. Mellor and P.N.R. Usherwood). Society of Chemical Industry, London, 1-10.
- PINE, M.D., HINEY, J.K., LEE, B., DEES, W.L. (2008). The pyrethroid pesticide esfenvalerate suppresses the afternoon rise of luteinizing hormone and delays puberty in female rats. *Environmental Health Perspectives*, 116(9):1243-1247.
- PION, P.D., KITTLESON, M.D., ROGERS, Q.R., MORRIS, J.G. (1987). Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science*, 237: 764-768.

- PITHON-CURI, T.C., SCHUMACHER, R.I., FREITAS, J.J., LAGRANHA, C., NEWSHOLME, P., PALANCH, A.C., DOI, S.Q., CURI, R. (2003). Glutamine delays spontaneous apoptosis in neutrophils. *American Journal of Physiology*, 284: 1355-1361.
- POWER, L.E., SUDAKIN, D.L. (2007). Pyrethrin and pyrethroid exposures in the United States: a longitudinal analysis of incidents reported to poison centers. *Journal of Medical Toxicology*, 3: 94-99.
- PRENTICE, H., MODI, J.P., WU, J.Y. (2015). Mecanismd of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volumen 2015, Article ID 964518, 7 pages.
- RAMADAN, A.A. (1988a). Action of pyrethroids on GABA_A receptor function. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 32: 97-105.
- RAMADAN, A.A., BAKRY, N.M., MAREI, A.-S.M., ELDEFRAWI, A.T., ELDEFRAWI, M.E. (1988b). Actions of pyrethroids on the peripheral benzodiazepine receptor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 32: 106-113.
- RAMOS LIMA, M.M., DE MELLO, M.A., CURI, R. (2002). Walker 256 tumour growth causes marked changes of glutamine metabolism in rat small intestine. *Cell Biochemistry and Function*, 20: 107-113.
- RANSON, H., JENSEN, B., VULULE, J.M., WANG, X., HEMINGWAY, J., COLLINS, F.H. (2000). Identification of a point mutation in voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Molecular Biology*, 9: 491-497.
- RANSON, H., N'GUESSAN, R., LINES, J., MOIROUX, N., NKUNI, Z., CORBEL, V. (2011). Pyrethroid resistance in African anopheles mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends in Parasitology*, 27: 91-98.
- RAY, D.E. Pyrethroid insecticides: mechanisms of toxicity, systemic poisoning síndrome, parestesia and therapy. (2001). In: "*Handbook of pesticide toxicology, vol. 2*". (Editor R. Kreiger). Academic Press, San Diego, CA, 1289-1303.
- RAY, D.E. AND CREMER, J.E. (1979). The action of decamethrin (a synthetic pyrethroid) on the rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 10: 333-340.
- RAY, D.E. AND FRY, J.R. (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology and Therapeutics*, 111: 174-193.
- RAY, D.E., LISTER, T., FORSHAW, P.J. (1999). A new basis for therapy against Type-II pyrethroid poisoning. In: "*Progress in Neuropharmacology and Neurotoxicology of Pesticides and Drugs*" (Editor D.J. Beadle). Royal Society of Chemistry, Cambridge, 204-214.
- RAY, D.E., SUTHARSAN, S., FORSHAW, P.J. (1997). Action of pyrethroid insecticides on voltage-gated chloride channels in neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, 18: 755-760.

- ROLLAND, A.S., HERRERO, M.T., GARCÍA-MARTÍNEZ, V., RUBERG, M., HIRSCH, E.C., FRANCOIS, C. (2007). Metabolic activity of cerebellar and basal ganglia-thalamic neurons is reduced in parkinsonism. *Brain*, 130: 265-275.
- ROMERO, A., RAMOS, E., CASTELLANO, V., MARTÍNEZ, M.A., ARES, I., MARTÍNEZ, M., MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R., ANADÓN, A. (2012). Cytotoxicity induced by deltamethrin and its metabolites in SH-SY5Y cells can be differentially prevented by selected antioxidants. *Toxicology in vitro*, 26: 823-830.
- RUCHALSKI, K., HATHOUT, G.M. (2012). A medley of midbrain maladies: a brief review of midbrain anatomy and syndromology for radiologists. *Radiology Research and Practice*, 2012:258524.
- RUZO, L.O., CASIDA, J.E. (1977). Metabolism and toxicology of pyrethroids with dihalovinyl substituents. *Environmental Health Perspectives*, 21: 285-292.
- RUZO, L.O., UNAI, T., CASIDA, J.E. (1978). Decamethrin metabolism in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 918-925.
- RYAN, B.J., HOEK, S., FON, E.A., WADE-MARTINS, R. (2015). Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends in Biochemical Science*, 40(4):200-210.
- SABATINI, U., BOULANOUAR, K., FABRE, N., MARTIN, F., CAREL, C., COLONNESE, C., BOZZAO, L., BERRY, I., MONTASTRUC, J.L., CHOLLET, F., RASCOL, O. (2000). Cortical motor reorganization in akinetic patients with Parkinson's disease: a functional MRI study. *Brain*, 123: 394-403.
- SADOWSKA-WODA, I., WOJCIK N., KAROWICZ-BILINSKA, A., BIESZCZAD-BEDREJCZUK, E. (2010). Effect of selected antioxidants in beta-cyfluthrin-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Toxicology in vitro*, 24: 879-884.
- SAILLENFAIT, A.M., NDIAYE, D., SABATÉ, J.P., DENIS, F., ANTOINE, G., ROBERT, A., ROUILLER-FABRE, V., MOISON, D. (2016). Evaluation of the effects of deltamethrin on the fetal rat testis. *Journal of Applied Toxicology*, 36(11):1505-1515.
- SARANSAARI, P., OJA, S.S. (1992). Release of GABA and taurine from brain slices. *Progress in Neurobiology*, 38: 455-482.
- SARANSAARI, P., OJA, S.S. (1997). Enhanced GABA release in cell-damaging conditions in the adult and developing mouse hippocampus. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 15: 163-174.
- SARANSAARI, P., OJA, S.S. (1998). Release of endogenous glutamate, aspartate, GABA and taurine from hippocampal slices from adult and developing mice under cell-damaging conditions. *Neurochemical Research*, 23: 563-570.
- SARANSAARI, P., OJA, S.S. (2000). Taurine and neural cell damage, *Amino Acids*, 19: 509-526.
- SASA, M., NISHI, A., KOBAYASHI, K., SANO, H., MOMIYAMA, T., URAMURA, K., YADA, T., MORI, N., SUZUKI, K., MINABE, Y. (2003). Regulation of psychomotor functions by dopamine: integration of various approaches. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 122: 215-225.

- SATTELLE, D.B., YAMAMOTO, D. (1988). Molecular targets of pyrethroid insecticides. *Advances in Insect Physiology*, 20: 147-213.
- SCHELL, M. J., COOPER, O. B., SNYDER, S.H. (1997). D-aspartate localizations imply neuronal and neuroendocrine roles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 2113-2018.
- SCHMAHMANN, J.D. (1997). Therapeutic and research implications. *International Review of Neurobiology*, 41: 637-647.
- SCHULER, T.H, MARTÍNEZ-TORRES, D., THOMPSON, A.J., DENHOLM, I., DEVONSHIRE, A.L., DUCE, I.R., WILLIAMSON, M.S. (1998). Toxicological, electrophysical, and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 29: 162-182.
- SCHURR, A., TSENG, M.T., WEST, C.A., RIGOR, B.M. (1987). Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sciences*, 40: 2059-2066.
- SEGURA-AGUILAR, J., PARIS, I., MUÑOZ, P., FERRARI, E., ZECCA, L., ZUCCA, F.A. (2014). Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 129(6):898-915.
- SEIFERT, J., CASIDA, J.E. (1985). Solubilization and detergent effects on interactions of some drugs and insecticides with the *t*-butylbicyclophosphorothionate binding site within the γ -aminobutyric acid receptor-ionophore complex. *Journal of Neurochemistry*, 44: 110-116.
- SEKI, Y., KIMURA, M., MIZUTANI, N., FUJITA, M., AIMI, Y., SUZUKI, Y. (2005). Cerebrospinal fluid taurine after traumatic brain injury. *Neurochemical research*, 30: 123-128.
- SHAFFER, T.J., MEYER, D.A., CROFTON, K.M. (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. *Environmental Health Perspectives*, 113: 123-136.
- SHIGEMOTO, R., KINOSHITA, A., WADA, E., NOMURA, S., OHISHI, H., TAKADA, M., FLOR, P.J., NEKI, A., ABE, T., NAKANISHI, S., MIZUNO, N. (1997). Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 17: 7503-7522.
- SKOOG, D.A., LEARY, J.J. (1994). Espectroscopía atómica basada en la atomización con llama y electrotérmica. En: *Análisis instrumental*. 4ª Edición, McGraw-Hill, 227-260.
- SMITH, T.J., SODERLUND, D.M. (2001). Potent actions of the pyrethroid insecticides cismethrin and cypermethrin on rat tetrodotoxin-resistant peripheral nerve (SNS/PN3) sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 70: 52-61.
- SNELL; R.S. (2006). Neuroanatomía clínica -6ª ed- Editorial Médica Panamericana (Buenos Aires), 244-265, 304-326, 332-337, 341-356, 416-427.

- SODERLUND, D.M. (2010). Toxicology and Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, *Elsevier Inc.*:1665-1686.
- SODERLUND, D.M. (2012). Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Archives of Toxicology*, 86(2): 165-181.
- SODERLUND, D.M., BLOOMQUIST, J.R. (1989). Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annual Review of Entomology*, 171: 3-59.
- SODERLUND, D.M., CLARK, J.M., SHEETS, L.P., MULLIN, L.S., PICCIRILLO, V.J., SARGENT, D., STEVENS, J.T., WEINER, M.L. (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171: 3-59.
- SODERLUND, D.M., KNIPPLE, D.C. (1999). Knockdown resistance to DDT and pyrethroids in the house fly (*Diptera: Muscidae*): from genetic trait to molecular mechanism. *Annals of the Entomological Society of America*, 92: 909-915.
- SODERLUND, D.M., KNIPPLE, D.C. (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 563-577.
- SODERLUND, D.M., LEE, S.H. (2001). Point mutations in homology domain II modify the sensitivity of rat Na_v1.8 sodium channels to the pyrethroid cismethrin. *Neurotoxicology*, 22: 755-765.
- SONG, J. H., NAGATA, K., TATEBAYASHI, H., NARAHASHI, T. (1996). Interactions of tetramethrin, fenvalerate and DDT at the sodium channel in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, 708: 29-37.
- STEIN, E.A., Washburn, M., Walczak, C., Bloom, A.S. (1987). Effects of pyrethroid insecticides on operant responding maintained by food. *Neurotoxicology and Teratology*, 9: 27-31.
- STOKES, A.H., HASTINGS, T.G. & VRANA, K.E. (1999). Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *Journal of Neuroscience Research*, 55(6): 659-665.
- STOKES, A.H., LEWIS, D.Y., LASH, L.H., JEROME, W.G., GRANT, K.W., ASCHNER, M. & VRANA, K.E. (2000). Dopamine toxicity in neuroblastoma cells: roles of glutathione depletion by L-BSO and apoptosis. *Brain Research*, 858(1): 1-8.
- STURMAN, J.A. (1993). Taurine in development. *Physiological Reviews*, 73: 119-148.
- SYMINGTON, S.B., CLARK, J.M. (2005). Action of deltamethrin on N-type (CaV2.2) voltage sensitive calcium channels in rat brain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82(1): 1-15.
- SYMINGTON, S.B., FRISBIE, R.K., LU, K.D., CLARK, J.M. (2007a). Action of cismethrin and deltamethrin on functional attributes of isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 172-181.
- SYMINGTON, S.B., FRISBIE, R.K., KIM, H-J, CLARK, J.M. (2007b). Mutation of threonine-422 to glutamic acid mimics the phosphorylation state and alters the action of deltamethrin on CaV2.2. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88: 312-320.

- SYMINGTON, S.B., FRISBIE, R.K., CLARK, J.M. (2008). Characterization of 11 commercial pyrethroids on the functional attributes of rat brain synaptosomes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 92: 61-69.
- SYMINGTON, S.B., HODGDON, H.E., FRISBIE, R.K., CLARK, J.M. (2011). Binary mixtures of pyrethroids produce differential effects on Ca^{2+} influx and glutamate release at isolated presynaptic nerve terminals from rat brain. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 131-139.
- SZE, C., BI, H., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K., FILLEY, C.M., MARTIN, L.J. (2001). N-Methyl-d-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 182: 151-159.
- TABAREAN, I.V., NARAHASHI, T. (1998). Potent modulation of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels by the Type II pyrethroid deltamethrin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284: 958-965.
- TADOLINI, B., PINTUS, G., PINNA, G. G., BENNARDINI, F., FRANCONI, F. (1995). Effects of taurine and hypotaurine on lipid peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213: 820-826.
- TAN, J., SODERLUND, D.M. (2009). Human and rat $\text{Nav}1.3$ voltage-gated sodium channels differ in inactivation properties and sensitivity to the pyrethroid insecticide tefluthrin. *Neurotoxicology*, 30: 81-89.
- TAN, J., SODERLUND, D.M. (2010). Divergent actions of S-bioallethrin, tefluthrin and deltamethrin on rat $\text{Nav}1.6$ sodium channels. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 247(3): 229-237.
- TAN, J., CHOI, J-S, SODERLUND, D.M. (2008). Action of pyrethroid insecticides on rat $\text{Nav}1.6$ sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *The Toxicologist*, 97 Abstract 2274.
- TAN, J.G., LIU, Z.Q., WANG, R.W., HUANG, Z.Y., CHEN, A.C., GUREVITZ, M., DONG, K. (2005). Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Molecular Pharmacology*, 67: 513-522.
- TANABE, Y., MASU, M., ISHII, T., SHIGEMOTO, R., NAKANISHI, S. (1992). A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron*, 8: 169-179.
- TERASAKA, H., TAMURA, A., TAKAYAMA, F., KASHIMATA, M., OHTOMO, K., MACHINO, M., FUJISAWA, S., TOGUCHI, M., KANDA, Y., KUNII, S., KUSAMA, K., ISHINO, A., WATANABE, S., SATOH, K., TAKANO, H., TAKAHAMA, M. & SAKAGAMI, H. (2000). Induction of apoptosis by dopamine in human oral tumor cell lines. *Anticancer Research*, 20(1A): 243-250.
- TOGA, A.W. (1997). Brain-mapping neurotoxicity and neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 820: 1-13.
- TROADEC, J. D., MARIEN, M., DARIOS, F., HARTMANN, A., RUBERG, M., COLPAERT, F., MICHEL, P. P. (2001) Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 79: 200-210.

- TROTTI, D., AOKI, M., PASINELLI, P., BERGER, U.V., DANBOLT, N.C., BROWN, R.H.J., HEDIGER, M.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutation has impaired glutamate clearance capacity. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 576-582.
- TRUDEAU, L.E. (2004). Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 29: 296-310.
- TSUJI, R., YAMADA, T., KAWAMURA, S. (2012). Mammal toxicology of synthetic pyrethroids. *Topics in Current Chemistry*, 314: 83-112.
- UEMATSU, A., TAN, B. Z., JOHANSEN, J. P. (2015) Projection specificity in heterogeneous locus coeruleus cell populations: implications for learning and memory. *Learning and Memory*, 22: 444-451.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). (2010). Environmental fate and ecological risk assessment problem formulation in support of registration review for deltamethrin. US Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C.
- USHERWOOD, P.N.R., VAIS, H., KHAMBAY, B.P.S., DAVIES, T.G., WILLIAMSON, M.S. (2005). Sensivity of *Drosophila para* sodium channel to DDT is not lowered by the *super-kdr* mutation M918T on the IIS4-S5 linker that profoundly reduces sensitivity to permethrin and deltamethrin. *FEBS letters*, 579: 6317-6325.
- VAIS, H., ATKINSON, S., ELDURSI, N., DEVONSHIRE, A.L., WILLIAMSON, M.S., USHERWOOD, P.N.R. (2000). A single amino acid change makes a rat neuronal sodium channel highly sensitive to pyrethroid insecticides. *FEBS letters*, 470: 135-138.
- VAIS, H., WILLIAMSON, M.S., DEVONSHIRE, A.L., USHERWOOD, P.N. (2001). The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Management Science*, 57: 877-888.
- VAN BOCKSTAELE, E. J., VALENTINO, R. J. (2013) Neuropeptide regulation of the locus coeruleus and opiate-induced plasticity of stress responses. *Advances in Pharmacology*, 68: 405-420.
- VAROL, S., ÖZDEMİR, H.H., ÇEVİK, M.U., ALTUN, Y., İBİLOĞLU, I., EKINCI, A., İBİLOĞLU, A.O., BALDUZ, M., ARSLAN, D., TEKIN, R., AKTAR, F., ALUÇLU, M.U. (2016). Protective effects of l-glutamine against toxicity of deltamethrin in the cerebral tissue, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12: 1005-1011.
- VERBIESE-GENARD, N., HANOCQ, M., ALVOET, C. & MOLLE, L. (1983). Degradation study of catecholamines, indole amines and some of their metabolites in different extraction media by chromatography and electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*, 134(1): 170-175.
- VERSCHOYLE, R.D., ALDRIDGE, W.N. (1980). Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. *Archives of Toxicology*, 45: 325-329.
- VEYRAC, A., DIDIER, A., COLPAERT, F., JOURDAN, F., MARIEN, M. (2005). Activation of noradrenergic transmission by alpha2-adrenoceptor antagonists

counteracts deafferentation-induced neuronal death and cell proliferation in the adult mouse olfactory bulb. *Experimental Neurology*, 194: 444-456.

VIJVERBERG, H.P.M., VAN DER BERCKEN, J. (1990). Neurotoxicological effects and the mode of action of pyrethroid insecticides. *Critical Reviews in Toxicology*, 21: 105-126.

VON BOHLEN UND HALBACH, O., DERMIETZEL, R. (2002). Neurotransmitters and Neuromodulators. Handbook of Receptors and Biological Effects. Wiley-VCH, Weinheim.

WAAGEPETERSEN, H.S., SONNEWALD, U., SCHOUSBOE, A. (2003). Compartmentation of Glutamine, Glutamate, and GABA Metabolism in Neurons and Astrocytes: Functional Implications. *Neuroscientist*, 9: 398-403.

WANG, H.P., LIANG, Y.J., SUN, Y.J., CHEN, J.X., HOU, W.Y., LONG, D.X., WU, Y.J. (2013). ¹H NMR-based metabolomic analysis of the serum and urine of rats following subchronic exposure to dichlorvos, deltamethrin, or a combination of these two pesticides. *Chemico-biological Interactions*, 203(3): 588-596.

WEYLER, W., HSU, Y.P. & BREAKFIELD, X.O. (1990). Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacology and Therapeutics*, 47(3): 391-417.

WHO/FAO (2002). Pesticide residues in food. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues. Rome, Italy.

WHO (1990). Environmental Health Criteria 97. Deltamethrin. Geneva, 1990.

WILLIAMSON, M.S., MARTÍNEZ-TORRES, D., HICK, C.A., DEVONSHIRE, A.L. (1996). Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Molecular and General Genetics*, 252: 51-60.

WOLANSKY, M.J. GENNINGS, C., CROFTON, K.M. (2006). Relative potencies for acute effects of pyrethroids on motor function in rats. *Toxicological Sciences*, 89: 271-277.

WOLANSKY, M.J., HARRILL, J.A. (2008). Neurobehavioral toxicology of pyrethroid insecticides in adult animals: a critical review. *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 55-78.

WU, A. AND LIU, Y. (2000). Apoptotic cell death in rat brain following deltamethrin treatment. *Neuroscience Letters*, 279: 85-88.

WU, A., LI, L., LIU, Y. (2003). Deltamethrin induces apoptotic cell death in cultured cerebral cortical neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 187: 50-57.

WU, H., JIN, Y., WEI, J., JIN, H., SHA, D., WU, J-Y. (2005). Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Research*, 1038: 123-131.

WU, J.Y., TANG, X.W., SCHLOSS, J.V., FAIMAN, M.D. (1998). Regulation of taurine biosynthesis and its physiological significance in the brain. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 442: 339-345.

- WU, S-N, WU, Y-H, CHEN, B-S, LIU, Y-C. (2009). Underlying mechanism of action of tefluthrin, a pyrethroid insecticide, on voltage-gated ion currents and on action currents in pituitary tumor (GH₃) cells and GnRH-secreting (GT1-7) neurons. *Toxicology*, 209: 70-77.
- WU, T., HALLETT, M. (2005). A functional MRI study of automatic movements in patients with Parkinson's disease. *Brain*, 128: 2250-2259
- WYLIE, C.E., CARBONELL-ANTOÑANZAS, M., AIASSA, E., DHOLLANDER, S., ZAGMUTT, F.J., BRODBELT, D.C., SOLANO-GALLEGU, L. (2014). A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. *Preventive Veterinary Medicine*, 117(1):19-27.
- YABU, H., YOSHINO, M., SOMEYA, T., TOTSUKA, M. (1989). Two types of Ca channels in smooth muscle cells isolated from guinea-pig taenia coli. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 255: 129-134.
- YADAV, S., JOHRI, A., DHAWAN, A., SETH, P.K., PARMAR, D. (2006). Regional specificity in deltamethrin induced cytochrome P450 expression in rat brain. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217: 15-24.
- YOSHII, M., TSUNOO, A., NARAHASHI, T (1985). Effects of pyrethroids and veratridine on two types of calcium channels in neuroblastoma cells. *Society for Neuroscience Abstract*, 11: 518.
- YU, G.D., LIU, Y.L., JIANG, X.H., GUO, S.Y. ZHANG, H.Q., YIN, Q.Z., HISAMITSU, T. (2001). The inhibitory effect of serotonin on the spontaneous discharge of suprachiasmatic neurons in hypothalamic slice is mediated by 5-HT(7) receptor. *Brain Research Bulletin*, 54: 395-398.
- ZHAO, P., HUANG, Y-L., CHENG, J-S. (1999). Taurine antagonizes calcium overload induced by glutamate or chemical hypoxia in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience Letters*, 268: 25-28.
- ZISTERER, D.M., WILLIAMS, D.C. (1997). Peripheral-type benzodiazepine receptors. *General Pharmacology*, 29: 305-314.
- ZWINGMANN, C., BUTTERWORTH, R. (2005). An update on the role of brain glutamine synthesis and its relation to cell-specific energy metabolism in the hyperammonemic brain: further studies using NMR spectroscopy. *Neurochemistry International*, 47: 19-30.

